

Aus dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Beeinflussung der intestinalen Folatresorption durch
Umweltkontaminanten am Beispiel eines humanen *in vitro* Modells**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Franziska Nieke
aus Leipzig

Leipzig, 2014

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Professor Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Professor Dr. Walther Honscha

Gutachter: Professor Dr. Walther Honscha
Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
An den Tierkliniken 15, 04103 Leipzig

Professor Dr. Pablo Steinberg
Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 2, 30559 Hannover

Tag der Verteidigung: 08.07.2014

Quidquid agis, prudenter agas et respice finem.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Folsäure und Folate	3
2.1.1 Struktur und Physiologie.....	3
2.1.2 Humanmedizinische Aspekte.....	4
2.1.2.1 Bedarf und Versorgung	4
2.1.2.2 Mangelsymptomatik	6
2.1.2.3 Toxische Wirkung	7
2.1.2.4 Strategien zur Verbesserung der Folatversorgung.....	8
2.2 Transportproteine für die Folataufnahme	9
2.2.1 Folatresorption	9
2.2.2 Reduced Folate Carrier (RFC, SLC19A1)	9
2.2.2.1 Struktur und Gewebeexpression.....	9
2.2.2.2 Regulationselemente.....	11
2.2.2.3 Eigenschaften der Transportaktivität.....	11
2.2.2.4 Bedeutung für die Folataufnahme	12
2.2.3 Proton-Coupled Folate Transporter (PCFT, SLC46A1)	13
2.2.3.1 Struktur und Gewebeexpression.....	13
2.2.3.2 Regulationselemente.....	13
2.2.3.3 Eigenschaften der Transportaktivität.....	14
2.2.3.4 Bedeutung für die Folataufnahme	14
2.2.4 Folatrezeptor α	15
2.3 Umweltkontaminanten	15
2.3.1 Überblick.....	15
2.3.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK).....	16
2.3.3 Halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK)	17
2.3.4 Regulationsmechanismen.....	21
2.3.4.1 AhR-Signalkaskade.....	21
2.3.4.2 Cytochrom P450-System	23
2.4 Zielsetzung der Arbeit.....	24

3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	26
3.1.2	Puffer und Lösungen.....	27
3.1.3	Geräte	30
3.1.4	Materialien für die Molekularbiologie und Proteinbiochemie	31
3.1.5	Materialien für die Zellkultur.....	34
3.2	Methoden	35
3.2.1	Zellbiologische Methoden	35
3.2.1.1	Allgemeine Zellkulturmethoden.....	35
3.2.1.2	Bestimmung der Zellviabilität in LS180-Zellen mittels WST-1-Test.....	36
3.2.1.3	Vorbehandlung der LS180-Zellen mit Cytochrom P450-Induktoren.....	37
3.2.1.4	Messung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylaseaktivität (EROD)	38
3.2.1.5	Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Folsäure.....	38
3.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	41
3.2.2.1	Isolation von RNA aus LS180-Zellen	41
3.2.2.2	Durchführung der cDNA-Synthese	42
3.2.2.3	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	43
3.2.2.4	Nachweis der Mykoplasmenfreiheit mittels RT-PCR.....	44
3.2.2.5	Klonierung von RFC- und PCFT-Teilsequenzen.....	45
3.2.2.6	Quantifizierung der RFC- und PCFT-mRNA durch TaqMan qRT-PCR.....	49
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	50
3.2.3.1	Western Blot-Analyse.....	50
3.2.3.2	Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Methode.....	52
3.2.4	Statistik	53
4	Ergebnisse.....	54
4.1	Charakterisierung der LS180-Zelllinie.....	54
4.1.1	Toxizitätsstudien.....	54
4.1.1.1	Zytotoxizität von TCDD, B[a]P, 3-MC.....	54
4.1.1.2	Zytotoxizität von Raltitrexed und Pemetrexed	55
4.1.1.3	Zytotoxizität von Salicylamid und CH-223191.....	56
4.1.2	EROD-Enzymaktivität	57
4.1.2.1	Einfluss von Induktoren.....	57

4.1.3	Nachweis der Transporter-mRNA mittels RT-PCR	61
4.1.3.1	Nachweis der Importcarrier für Folate	61
4.1.3.2	Nachweis der Exportcarrier für Folate	62
4.1.4	Nachweis des RFC- und PCFT-Transportproteins mittels Western Blot	63
4.2	Zelluläre Aufnahme von radioaktiv markierter Folsäure	64
4.2.1	Charakterisierung der Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure in LS180-Zellen	64
4.2.1.1	Abhängigkeit von der Substratkonzentration	65
4.2.1.2	Kinetische Parameter	66
4.2.1.3	Einfluss des Konfluenzgrades des Monolayers.....	67
4.2.1.4	Aufnahme bei 4 °C.....	68
4.2.2	Einfluss von Inhibitoren auf die zellvermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure	69
4.2.2.1	Bestimmung des IC_{50} und des K_i -Wertes	73
4.2.3	Einfluss von TCDD und B[a]P auf die zellvermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure ...	74
4.2.3.1	Modulation in Abhängigkeit von der Substanzdosis	75
4.2.3.2	Modulation in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer	77
4.2.3.3	Einfluss von TCDD und B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten.....	79
4.3	Quantifizierung der RFC- und PCFT-mRNA in LS180-Zellen	82
4.3.1	Generierung der Standardreihen.....	82
4.3.2	Modulation der Genexpression von RFC und PCFT durch AhR-Liganden.....	84
4.3.2.1	Dosisabhängige Genexpressionsmuster.....	84
4.3.2.2	Zeitabhängige Genexpressionsmuster	86
4.3.2.3	Einfluss von TCDD und B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten.....	88
5	Diskussion	91
5.1	LS180-Zellen als Modell für Transportvorgänge am Darm.....	91
5.1.1	Zytotoxizitätsstudien in den LS180-Zellen	93
5.1.2	Funktionalität der AhR-Signalkaskade	95
5.1.3	Nachweis der Import- und Exportcarrier für Folate	97
5.2	Funktionelle Untersuchungen zur Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure in LS180-Zellen	98
5.2.1	Funktionelle Charakterisierung der $^3\text{[H]}$ -Folsäureaufnahme in LS180-Zellen	98
5.2.2	Differenzierung zwischen den beteiligten Transportproteinen an der $^3\text{[H]}$ -Folsäureaufnahme.....	100
5.2.3	Beeinflussung durch TCDD und B[a]P	103
5.3	Regulation der Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen	105

5.4	Ausblick.....	107
6	Zusammenfassung.....	109
7	Summary.....	111
8	Literaturverzeichnis	113
9	Anhang.....	133
10	Danksagung	139

Abkürzungsverzeichnis

³ [H]	Tritium
3-MC	3-Methylcholanthren
5-FTHF	5-Formyltetrahydrofolat
5-MTHF	5-Methyltetrahydrofolat
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
ABCB1	Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1)
ABCC	Multidrug Resistance-associated Proteins
ABCG2	Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)
ABC	ATP-Binding Cassette
ACTB	β-Actin
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
AhRR	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Activating Protein-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nuklear-Translokator
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
B[a]P	Benzo[a]pyren
Barbie-Box	Barbiturate recognition sequence
BCA	Bicinchoninsäure
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CH	CH-223191 = 1-Methyl-N-{2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazen-1-yl]phenyl}-1H-pyrazol-5-carboxamid
Ci	Curie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cSt	centi Stokes
CYP	Cytochrom P450
CYP1A1	Cytochrom P450 Isoenzym 1A1
d	Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMEM	Dulbecco modified Eagle's medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOC	Natriumdesoxycholat
dpm	Zerfallereignisse pro Minute
DRE	Dioxin Response Element
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPA	Enviromental Protection Agency (U.S.)
ER	Estrogenrezeptor
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylase
EtOH	Ethanol
EUROCAT	European Registration of Congenital Abnormalities and Twins
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FCS	fötales Kälberserum
FOLR	Folatrezeptor
FR α	Folatrezeptor α
GARFT	Glycinamid-Ribonukleotid-Formyltransferase
GITC	Guanidium Isothiocyanat
GR	Glucocorticoid Receptor
h	Stunde
HAK	halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe
HCP-1	Haem Carrier Protein-1
HFM	hereditäre Folat-Malabsorption
HNF4 α	Hepatocyte Nuclear Factor-4- α
hRfc	humaner Reduced Folate Carrier
HSP90	Heat Shock Protein 90
i. d. r.	in der Regel
IOM	Institute of Medicine (US)
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K _i	Hemmkonstante
K _m	Michaelis-Konstante, gibt die Substratkonzentration an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist
L	Liter
LD ₅₀	Dosis, deren letaler Effekt sich auf 50 Prozent der beobachteten Population bezieht
MCS	Multiple Cloning Site
MCV	Mean Corpuscular Volume
MDR1	Multidrug Resistance Protein 1 (ABCB1)
MEM	Minimum Essential Medium
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

MG	Monoglutamate
min	Minute
MP	Milchpulver
MRI	Max-Rubner Institut, Bundeforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel
mRNA	messenger RNA
MRP	Multidrug Resistance-associated Proteins (ABCC)
MTX	Methotrexat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEAA	Non-Essential Amino Acids
ng	Nanogramm
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NRC	National Research Council (U.S.)
NRD	Neuralrohrdefekte
n. s.	nicht signifikant
OD	optische Dichte
ÖGE	Österreichische Gesellschaft für Ernährung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAS	Akronym für <u>P</u> ER- <u>A</u> RNT- <u>S</u> IM (homologe Proteine aus Drosophila)
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCBs	polychlorierte Biphenyle
PCDD	polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDF	polychlorierte Dibenzofurane
PCFT	Proton-Coupled Folate Transporter
PCI	Gemisch aus Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin + Streptomycin
PG	Polyglutamate
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Picomol
PMX	Pemetrexed
PteGlu	Pteroylmonoglutaminsäure
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
qRT-PCR	quantitative real-time RT-PCR
RE	Response Element
RFC	Reduced Folate Carrier
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RTX	Raltitrexed
s	Sekunde
s.	siehe
SAL	Salicylamid (2-Hydroxybenzamid)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SGE	Schweizerische Gesellschaft für Ernährung
SLC	Solute Carrier
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SVE	Schweizerische Vereinigung für Ernährung
SXR	Steroid and Xenobiotic Receptor
TAMRA	6-Carboxy-Tetramethylrhodamin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline Tween
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEF	Toxizitätsäquivalenzfaktoren
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEQ	Toxizitätsäquivalente
THF	5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure
Tm	Schmelzpunkt
TMD	Transmembrandomänen
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TS	Thymidylat-Synthase
U	units
u. a.	unter anderem
V	Volt
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
V_{influx}	Aufnahmerate
v/v	Volumenanteil
w/v	Massenkonzentration
w/w	Massenanteil
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WST-1	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
XRE	Xenobiotic Response Element
YY1	Yin Yang 1
z. B.	zum Beispiel
β -ME	β -Mercaptoethanol

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Empfehlungen für die Folatzufuhr
Tabelle 2:	Primer für die RT-PCR
Tabelle 3:	Primer für den Mykoplasmentest
Tabelle 4:	Primer für die qRT-PCR
Tabelle 5:	Primer für die Klonierung
Tabelle 6:	Schema für die Vorbehandlung der LS180-Zellen mit Cytochrom P450-Induktoren sowie AhR-Antagonisten
Tabelle 7:	Reaktionsansatz für 20 µl cDNA
Tabelle 8:	Reaktionsansatz für die RT-PCR (50 µl)
Tabelle 9:	Reaktionsansatz für 20 µl Restriktionsdoppelverdau
Tabelle 10:	Restriktionsanalyse der RFC/PCFT-Klone
Tabelle 11:	Standardreaktionsansatz für die qRT-PCR (25 µl)
Tabelle 12:	Zusammensetzung eines 10 %igen Polyacrylamidgels
Tabelle 13:	Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme nach Inkubation der LS180-Zellen mit 10 nM TCDD oder 1 µM B[a]P über 72 h
Tabelle 14:	Statistische Daten zur Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch TCDD oder B[a]P in Abhängigkeit von der Dosis
Tabelle A1:	Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme (0,1 µM) in LS180-Zellen nach Zugabe von PMX oder RTX
Tabelle A2:	Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme nach Inkubation der LS180-Zellen mit AhR-Agonisten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit
Tabelle A3:	Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme nach Inkubation der LS180-Zellen mit TCDD in Kombination mit AhR-Antagonisten
Tabelle A4:	Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme nach Inkubation der LS180-Zellen mit B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten
Tabelle A5:	Statistische Auswertung zwischen den relativen mRNA-Mengen von RFC und PCFT in Abhängigkeit von TCDD oder B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformel der Folsäure
Abbildung 2:	Strukturformeln Benzo[a]pyren und 3-Methylcholanthren
Abbildung 3:	Strukturformeln halogener aromatischer Kohlenwasserstoffe
Abbildung 4:	Schema AhR-Signalkaskade
Abbildung 5:	Toxizität von B[a]P, TCDD und 3-MC in LS180-Zellen
Abbildung 6:	Zytotoxischer Einfluss von RTX und PMX auf die LS180-Zelllinie
Abbildung 7:	Toxizität von SAL und CH in LS180-Zellen
Abbildung 8:	Induktion der EROD-Aktivität in LS180-Zellen durch TCDD
Abbildung 9:	Induktion der EROD-Aktivität in LS180-Zellen durch B[a]P
Abbildung 10:	Induktion der EROD-Aktivität in LS180-Zellen durch 3-MC
Abbildung 11:	Nachweis der mRNA von FOLR1, PCFT und RFC in LS180-Zellen durch RT-PCR
Abbildung 12:	Nachweis der mRNA von MRP1 - 6, MDR1 und BCRP in LS180-Zellen durch RT-PCR
Abbildung 13:	Western Blot-Analyse des RFC- und PCFT-Transportproteins in der LS180-Zelllinie
Abbildung 14:	Kurvendarstellung der $^3\text{[H]}$ -Folsäureaufnahme in LS180-Zellen
Abbildung 15:	Bestimmung von K_m und V_{max} der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen
Abbildung 16:	Folsäureaufnahme in LS180-Zellen in Abhängigkeit vom Grad der Zellkonfluenz
Abbildung 17:	Temperaturabhängigkeit der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen
Abbildung 18:	Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch Antifolate
Abbildung 19:	Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch RTX
Abbildung 20:	Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch PMX
Abbildung 21:	Beeinflussung der Folsäureaufnahme (20 μM) in LS180-Zellen durch Antifolate
Abbildung 22:	Hemmkurven der $^3\text{[H]}$ -Folsäureaufnahme durch Antifolate
Abbildung 23:	Funktionelle Transportaktivität in LS180-Zellen nach 72 h Inkubation mit AhR-Agonisten
Abbildung 24:	Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch TCDD oder B[a]P in Abhängigkeit von der Dosis
Abbildung 25:	Einfluss von AhR-Agonisten auf die funktionelle Folsäureaufnahme in LS180-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer
Abbildung 26:	Modulation der funktionellen Folsäureaufnahme durch TCDD und Salicylamid
Abbildung 27:	Einfluss von TCDD in Kombination mit CH 223191 auf die funktionelle Folsäureaufnahme in LS180-Zellen
Abbildung 28:	Modulation der funktionellen Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten

- Abbildung 29: Restriktionsschnitt der Plasmid-DNA
- Abbildung 30: Kontrolle der RFC- und PCFT-Klone mittels Restriktionsschnitt und RT-PCR
- Abbildung 31: Modulation der Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen durch AhR-Agonisten nach 72 h in Abhängigkeit von der Substanzdosis
- Abbildung 32: Modulation der Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen durch AhR-Agonisten nach 120 h in Abhängigkeit von der Dosis
- Abbildung 33: RFC- und PCFT-Genexpression in LS180-Zellen nach Inkubation mit 10 nM TCDD über 24 – 120 h
- Abbildung 34: RFC- und PCFT-Genexpression in LS180-Zellen nach Inkubation mit B[a]P über 24 - 120 h
- Abbildung 35: Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen nach Vorbehandlung mit TCDD in Kombination mit AhR-Antagonisten
- Abbildung 36: Einfluss von B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten auf die RFC- und PCFT-Genexpression in LS180-Zellen

1 Einleitung

Die Gruppe der Folate gehört zu den wasserlöslichen essentiellen Vitaminen, die Säugetiere in ausreichender Menge über den Gastrointestinaltrakt aufnehmen müssen. Zu unterscheiden sind die synthetisch hergestellte Folsäure und ihre in Lebensmitteln natürlich vorkommenden Derivate, die sich unter anderem in der Anzahl der gebundenen Glutaminsäurereste - von denen über das Carboxylende bis zu 8 gebunden sein können - unterscheiden. Dies hat Einfluss auf die Stabilität und Resorbierbarkeit der Verbindung. Folate spielen eine entscheidende Rolle im Zellstoffwechsel, da sie als Überträger von C1-Fragmenten verschiedener Oxidationsstufen direkt an der Nukleinsäuresynthese beteiligt sind. Zudem werden sie im Intermediärstoffwechsel von Aminosäuren und als Cofaktoren verschiedener Enzyme benötigt. Zur Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktionen ist eine ausreichende Versorgung mit Folaten also unbedingt notwendig. Ein suboptimaler Folatstatus kann zur Ausbildung einer megaloblastären Anämie führen und während der Schwangerschaft das Risiko von embryonalen Neuralrohrdefekten stark erhöhen (CASTLE 1978, OAKLEY 2002). Die weitere medizinische Relevanz der Folate steht momentan in der Diskussion, wie beispielsweise der protektive Effekt in Bezug auf bestimmte Krebsformen, die Risikoreduktion für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Zusammenhänge zwischen dem Folatstatus und neurologischen Störungen wie Alzheimer und Depressionen.

Wie bereits oben erwähnt, können Säuger Folate jedoch nicht selber synthetisieren, so dass spezifische Transporter existieren, um die Folataufnahme aus externen Quellen über den Verdauungstrakt zu realisieren. Nach heutigem Kenntnisstand spielen dabei vor allem der Reduced Folate Carrier (RFC) und der Proton-Coupled Folate Transporter (PCFT) die größte Rolle. Sie gehören beide der „Solute Carrier“ (SLC) Superfamilie an (Familie SLC19 bzw. SLC46) und besitzen 12 Transmembrandomänen. Der RFC ist schon seit langem bekannt und war bereits Gegenstand intensiver Forschung. Dieser sekundär aktive Carrier wird ubiquitär in Säugerorganismen exprimiert, wobei sein Arbeitsoptimum bei neutralem pH-Wert liegt. Ihn zeichnet eine hohe Substrataffinität für reduzierte Folate aber eine geringe Transportkapazität aus. Der PCFT wurde erst wenigen Jahren beschrieben (QIU et al. 2006, NAKAI et al. 2007). Ursprünglich wurde er als Haem-Carrier charakterisiert, da er neben Folaten auch Haem transportiert (SHAYEGHI et al. 2005). Er konnte bisher insbesondere in intestinalem, hepatischem und renalem Gewebe nachgewiesen werden. Der Transport erfolgt im Gegensatz zum RFC wahrscheinlich über einen Symport mit einem Proton und das pH-Optimum liegt eher im sauren Bereich. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre geben Hinweise darauf, dass er eine größere Bedeutung für die intestinale Folataufnahme hat als der RFC (YUASA et al. 2009, SHIN et al. 2013). Es existiert noch ein weiterer spezifischer Transporter, der Folatrezeptor alpha (FR α). Ergebnisse von WANG et al. (2005) und WEITMAN et al. (1992) deuten aber darauf hin, dass er in diesem Zusammenhang eine eher untergeordnete Rolle spielt.

Trotz der Existenz dieser spezifischen Transporter ist der Folatmangel des Menschen insbesondere in Industrieländern wie Deutschland weit verbreitet (BEITZ et al. 2002, OAKLEY 2002, GARCIA-CASAL et al. 2005). Er lässt sich durch eine ernährungsphysiologische Problematik, d. h. eine mangelhafte Aufnahme von Folat, nur unzureichend erklären. Möglicherweise liegt dieser Mangel, zumindest zum Teil, in einer Rezeptor-vermittelten Herabregulation der Transportproteine begründet. Denn in der Promoterregion der Gene von RFC und PCFT existieren verschiedene Regulationselemente, unter anderem auch funktionell aktive DREs (Dioxin Response Element), die als Bindungsstelle für den nukleären Arylhydrocarbon-Rezeptor

(AhR) dienen. Sie bestehen aus einer kurzen Kernsequenz mit der Basenfolge 5'-GCGTG-3' und flankierenden Regionen aus jeweils 7 Basen. Entdeckt wurden sie ursprünglich in fremdstoff-metabolisierenden mitochondrialen Cytochrom P450-Isoenzymen wie dem bekannten CYP1A1 oder 1B1. Der AhR ist ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor, der durch endogene und exogene Liganden aktiviert wird. Dies führt zu einer Konformationsänderung des AhR und als Folge zu einer Translokation in den Zellkern. Nach Ablösung der Heat Shock Proteine, die als Chaperone fungieren, kommt es zur Dimerisierung mit dem Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nuklear-Translokator (ARNT). Dieses Heterodimer bildet den funktionellen Transkriptionsfaktor, welcher an DREs binden kann und zu einer transkriptionellen Regulation von Genen führt.

Die Bindungsstelle des AhR stellt sich als relativ unspezifisch dar, weshalb wahrscheinlich eine Vielzahl von Substanzen den AhR aktivieren kann (DENISON und NAGY 2003, ZHAO et al. 2010). Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang ubiquitär verbreitete Umweltkontaminanten aus den Substanzklassen der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) wie B[a]P oder 3-MC und der halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (HAK) wie das bekannte TCDD, da sie in der Umwelt sehr persistent sind und sich dadurch in der Lebensmittelkette anreichern. Es ist allgemein anerkannt, dass die toxischen und kanzerogenen Effekte dieser Substanzen über den AhR-Signalweg vermittelt werden, wobei deren komplexe Vorgänge Gegenstand aktueller Forschung sind.

Innerhalb dieser Arbeit soll der mögliche Einfluss von CYP P450-Induktoren auf die carriervermittelte intestinale Folatresorption in einem der *in vivo* Situation nahestehenden humanen *in vitro* Zellkulturmodell untersucht werden. Zusätzlich soll geklärt werden, ob es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von zahlreichen Kontaminanten in der Umwelt sowie in Lebensmitteln und dem Folatmangel des Menschen gibt, auch in Hinsicht einer möglichen Bedeutung für den Verbraucherschutz.

2 Literaturübersicht

2.1 Folsäure und Folate

2.1.1 Struktur und Physiologie

Folat (lat. folium, „das Blatt“) stellt den Oberbegriff für ein wasserlösliches B-Vitamin dar, mit dem die Summe der folatwirksamen Verbindungen bezeichnet wird. Zu unterscheiden sind die synthetisch hergestellte Folsäure und ihre in Lebensmitteln natürlich vorkommenden Derivate. Chemisch betrachtet handelt es sich bei Folsäure um eine Pteroylmonoglutaminsäure (PteGlu), bestehend aus einem Pteridinring (2-Amino-4-hydroxy-pteridin), der über eine Methylenbrücke mit einem p-Aminobenzoessäurering und einer L-Glutaminsäure verknüpft ist (s. Abbildung 1). Die natürlich vorkommenden Verbindungen unterscheiden sich in der Anzahl der gebundenen Glutaminsäurereste, von denen über das Carboxylende bis zu 8 gebunden sein können, dem Hydrierungsgrad des Pteridinrings sowie der Bindung verschiedener C1-Einheiten an den Atomen N5 und N10.

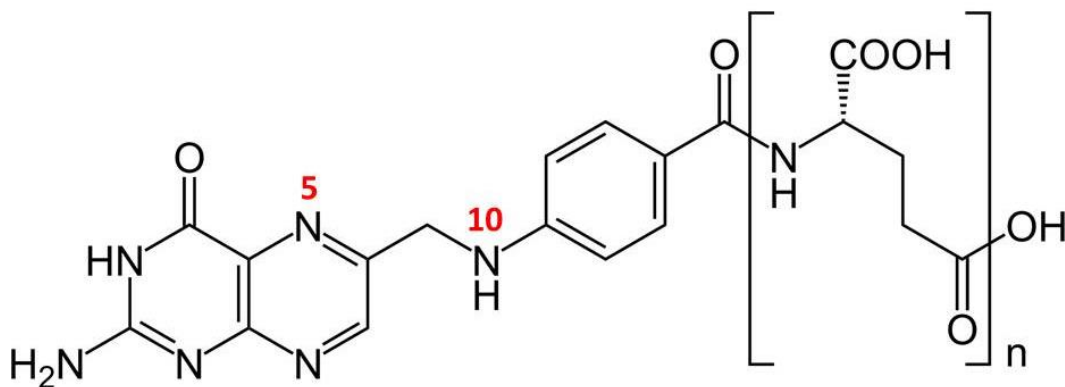


Abbildung 1: Strukturformel der Folsäure

Die Hauptaufgabe der Folate im menschlichen und tierischen Organismus ist die Übertragung von C1-Kohlenstoffeinheiten verschiedener Oxidationsstufen in der Rolle eines Coenzym. Die biologisch aktiven Coenzymformen der Folate stellen dabei die Polyglutamate der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (THF) und ihre Derivate dar. Die Folsäure selbst als Monoglutamat ist metabolisch inaktiv, kann aber mittels des Enzyms Dihydrofolatreduktase über eine Zwischenstufe (7,8-Dihydrofolsäure) in THF umgewandelt werden.

Die C1-Fragmente treten in Form von Methyl-, Formyl-, Formiat- und Hydroxymethylresten auf und stammen vor allem von den Aminosäuren Histidin, Serin und Glycin. Die C1-substituierten Folatderivate sind an zahlreichen Stoffwechselwegen beteiligt, unter anderem an der Biosynthese von Purin-Nukleotiden (Adenosin, Guanin) und Pyrimidinen (Thymidylat) sowie der Interkonversion von verschiedenen Aminosäuren (APPLING 1991, KAMEN 1997). Über die Remethylierung von Homocystein zu Methionin besteht zudem eine Schnittstelle mit dem Vitamin-B₁₂ (Cobalamin)-Stoffwechsel, über den es zur wechselseitigen metabolischen Beeinflussung kommt, da dieser Schritt gleichzeitig zu einer Regeneration des inaktiven 5-Methyl-THF zu THF führt. Methionin kann dann mit ATP weiter zu S-Adenosylmethionin reagieren, dem wichtigsten Methylgruppendonor im Intermediärstoffwechsel

(MCPARTLIN 2005). Somit spielen Folate, insbesondere durch die Beteiligung an der DNA- und RNA-Biosynthese, eine entscheidende Rolle im Zellstoffwechsel (STANGER 2002).

Während höhere Pflanzen und Mikroorganismen in der Lage sind, Folate *de novo* zu synthetisieren, stellt es für Säugetiere ein essentielles Vitamin dar, dass in ausreichender Menge über die Nahrung aufgenommen werden muss (SAID et al. 2000). Allerdings sind nur in wenigen Lebensmitteln größere Mengen Folat enthalten. Zu finden sind sie unter anderem in Vollkornprodukten, Kalbs- und Geflügelleber, verschiedenen grünen Gemüsesorten wie Brokkoli, Spinat oder Grünkohl, in Nüssen, Orangen, sowie in Weizenkeimen und Eiern (SOUCI et al. 1989). Zudem stellen alkoholfreie Getränke wie z. B. Multivitaminsaft eine Hauptquelle für Folsäure in der menschlichen Ernährung dar.

In natürlichen Lebensmitteln treten sowohl Mono- als auch Polyglutamate auf, wobei die Hauptmenge der Nahrungsfolate auf die Polyglutamate entfällt. Während die Absorption der Monoglutamate nahezu vollständig erfolgt, sind die PteGlu₂₋₈ in der Regel deutlich schlechter resorbierbar, da sie zunächst enzymatisch durch eine primär im Bürstensaum jejunaler Mukosazellen lokalisierte zinkabhängige γ -Glutamat-Carboxypeptidase II zu Monoglutamatverbindungen hydrolysiert werden müssen. Eine vollständige Hydrolyse ist insbesondere mit steigender Anzahl der Glutamatreste kaum möglich, da die Enzymaktivität insgesamt begrenzt ist (CHANDLER et al. 1986). Weitere Faktoren, welche die Bioverfügbarkeit von Nahrungsfolaten beeinflussen können, sind die Beschaffenheit der Lebensmittelmatrix, der pH-Wert im Darm sowie die Anwesenheit von Folatbindungsproteinen im Lebensmittel (CHANDLER et al. 1986, GREGORY 2001). Die durchschnittliche Bioverfügbarkeit von Nahrungsfolaten wird auf etwa 50 % geschätzt, wobei Folate tierischen Ursprungs in der Regel besser verwertet werden können (IOM 2000).

Darüber hinaus kann anhaltende Hitze oder ultraviolettes Licht zu einer Inaktivierung des Vitamins führen. Infolgedessen wird hauptsächlich Folsäure als Supplement verwendet, da sie nahezu quantitativ bioverfügbar ist und die stabilste Form des Vitamins darstellt (MCPARTLIN 2005).

2.1.2 Humanmedizinische Aspekte

2.1.2.1 Bedarf und Versorgung

Sowohl in Deutschland als auch in vielen anderen Ländern zählt Folat nach wie vor zu den Mikronährstoffen, bei denen am häufigsten eine Mangelsituation beobachtet werden kann.

So konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass ein großer Teil der Bevölkerung, insbesondere in Industrieländern, an einer Unterversorgung leidet (BEITZ et al. 2002, OAKLEY 2002, GARCIA-CASAL et al. 2005). Sowohl den Daten der Nationalen Verzehrsstudie II (MRI 2008) als auch des Ernährungssurveys 2008 (MENSINK et al. 2002) kann man entnehmen, dass in Deutschland die Zufuhr von Folat-Äquivalenten für alle Altersgruppen im Median deutlich unterhalb der D-A-CH Referenzwerte (definiert von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE), der Österreichischen Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), der Schweizerischen Gesellschaft für Ernährungsforschung (SGE) sowie der Schweizerischen Vereinigung für Ernährung (SVE)) liegt (s. Tabelle 1). So unterschreiten 79 % der Männer und 86 % der Frauen die Empfehlungen für die Folatzufuhr und nahmen im Median 207 bzw. 108 μg pro Tag zu sich. Zudem zeigt sich, dass sogar mit Supplementation 30 % der Bevölkerung in Deutschland nicht die empfohlenen Mengen

erreichen. Obwohl für die zugrundeliegenden D-A-CH-Referenzwerte aktuell im Jahr 2013 eine Anpassung erfolgte, im Zuge derer fast alle Empfehlungswerte nach unten korrigiert wurden, wird die Versorgung mit Folaten noch immer als mangelhaft beurteilt (DGE 2013).

Hinzu kommt, dass sich die Folatmangelsituation in Industrieländern durch die ernährungsphysiologische Problematik, d. h. eine mangelhafte Aufnahme von Folat-Äquivalenten, nur unzureichend erklären lässt. Neben der verminderten Aufnahme von Folat-Äquivalenten können auch eine gestörte Resorption, verschiedene Stoffwechselstörungen, Medikamentenwechselwirkungen und ein erhöhter Bedarf zu einer Unterversorgung führen (ALLEN 2008). Eine gestörte Resorption kann man bei verschiedenen angeborenen und erworbenen Malabsorptionen sowie Leber- oder Pankreaserkrankungen finden (GELLER et al. 2002, CARIO et al. 2011, ONAL 2014). Zu den Stoffwechselstörungen gehören zum Beispiel die IBD (Inflammatory bowel disease), mit der eine Reihe von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa zusammengefasst werden (FRANKLIN und ROSENBERG 1973). Eine verringerte Folataufnahme durch Wechselwirkungen mit Medikamenten konnte bisher für eine Reihe von Substanzen wie Phenytoin, Diphenylhydantoin, Primidon, Trimetoprim, Pyrimethamin, Triamteren, orale Kontrazeptiva, Barbiturate, Sulphasalazin und Acetylsalicylsäure gezeigt werden (ROSENBERG 1972, SCOTT und WEIR 1980). Auch chronischer Alkoholmissbrauch scheint einen hemmenden Effekt auf die Folataufnahme auszuüben (WANI et al. 2012).

Tabelle 1: Empfehlungen für die Folatzufuhr
D-A-CH-Referenzwerte (DGE 2013)

Alter	Folsäure µg-Äquivalent/Tag
Säuglinge	
0 bis unter 4 Monate	60
4 bis unter 12 Monate	85
Kinder	
1 bis unter 4 Jahre	120
4 bis unter 7 Jahre	140
7 bis unter 10 Jahre	180
10 bis unter 13 Jahre	240
13 bis unter 15 Jahre	300
Jugendliche und Erwachsene	
15 bis unter 19 Jahre	300
19 bis unter 25 Jahre	300
25 bis unter 51 Jahre	300
51 bis unter 65 Jahre	300
65 Jahre und älter	300
Schwangere	550
Stillende	450

Mangelsymptomatik

Da folatwirksame Verbindungen insbesondere bei Prozessen der Zellteilung und -differenzierung benötigt werden, manifestiert sich ein Mangel primär in Zellsystemen mit hoher Zellteilungsrate. Besonders betroffen sind dabei die blutbildenden Zellen sowie die Mukosazellen des Darms und des Urogenitaltraktes. Ein erhöhter Bedarf an Folaten besteht zudem in der Schwangerschaft, in Wachstumsphasen sowie bei Infekten, Hämodialyse und hämolytischen Anämien.

Klinische Symptomatik

Die Symptome eines Folatmangels sind abhängig von der Schwere und Dauer des Mangelzustandes. Die Leber als Hauptstoffwechsel- und Hauptspeicherorgan von Folat gewährleistet auch bei fehlender oder anhaltend niedriger Zufuhr über 3 bis 4 Wochen die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Serumfolatkonzentration (PIETRZIK et al. 2008).

Als Leitbefund für einen länger andauernden Folatmangel gilt die megaloblastäre Anämie, die sich durch zirkulierende hyperchrome, makrozytäre Erythrozyten (erhöhtes Mean Corpuscular Volume (MCV)) und ihre megaloblastischen Vorläufer auszeichnet, häufig einhergehend mit einer Leukopenie und Thrombozytopenie. Sie entstehen aufgrund der gestörten Nukleotid-Synthese, die zu einer Entwicklungsdiskrepanz zwischen Kern und Zytoplasma mit verzögerter Kernreife führt (CASTLE 1978). Allerdings lässt sich die megaloblastische Anämie hämatologisch nicht von einer perniziösen Anämie aufgrund einer Cobalamin-Defizienz unterscheiden, da eine Überschneidung im Metabolismus der beiden Mikronährstoffe vorliegt (s. 2.1.1). Bei fortgesetztem Mangel können auch Veränderungen an den Schleimhäuten und gastrointestinale Störungen, einhergehend mit verminderter Resorptionsleistung des Darmes beobachtet werden (BHANDARI und GREGORY 1992, MCPARTLIN 2005).

Da Folat für die Metabolisierung von Homocystein benötigt wird, sind Folat- und Homocysteinwerte invers korreliert. Hohe Homocysteinwerte werden in der Literatur mit einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen in Verbindung gebracht und können zur Früherkennung eines Folatmangels im Blut gemessen werden (TCHANTCHOU 2006).

Subklinischer Mangel

Herausragende Bedeutung besitzen Folate in der Schwangerschaft, wo ihnen bei der Entwicklung des fetalen Nervensystems eine besondere Rolle zukommt. Bei einem zu niedrigen Folatstatus der Mutter erhöht sich die Gefahr eines verzögerten Fetenwachstums und verminderten Geburtsgewichtes. Zudem steigt das Risiko für das Kind, eine Schädigung des Neuralrohrs zu erleiden. Unter dem Begriff Neuralrohrdefekte (NRD) werden jene Fehlbildungen zusammengefasst, bei denen sich das Neuralrohr des Fetus nicht oder nur unvollständig schließt. Als häufigste Missbildungen treten dabei Anencephalie (teilweise oder völliges Fehlen des Großhirns) und die Spina bifida (offener Rücken) auf (HERTRAMPF und CORTES 2004). Da sich diese Defekte in der frühen Embryonalphase (22. - 28. Schwangerschaftstag) ausbilden, kommt einer ausreichenden Folatversorgung insbesondere perikonzeptionell eine große Bedeutung zu (OAKLEY 2002). In Deutschland liegt die Häufigkeit von NRD noch immer bei etwa einem Fall pro 1000 Neugeborene (HESEKER et al. 2009). Die Gesamtinzidenz müsste jedoch wesentlich höher angesetzt werden, wenn man medizinisch indizierte Schwangerschaftsabbrüche mit einrechnen würde. Zudem weisen Studien darauf hin, dass eine ausreichende Folatversorgung auch das Risiko für das

Auftreten weiterer Fehlbildungen wie z. B. von Lippen- und Gaumenspalten oder angeborenen Herzfehlern vermindern kann (BUTALI et al. 2013).

Auch neben der Schwangerschaft kann ein subklinischer Folatmangel klinische Bedeutung haben. Inzwischen wird ein Zusammenhang mit vielen verschiedenen gesundheitlichen Aspekten diskutiert. Als diagnostischer Faktor werden dabei häufig erhöhte Homocysteinwerte verwendet, die invers mit den Folsäurewerten im Serum korrelieren. Schon seit längerem bekannt ist der Einfluss auf Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Ein erhöhter Homocysteinspiegel gilt unter anderem als Risikofaktor für Arteriosklerose und steigert somit das Risiko für einen Herzinfarkt oder Schlaganfall (WANG et al. 2007, QIN et al. 2012). Auch ein Zusammenhang mit weiteren Herz-Kreislaufkrankungen wie z. B. arteriellen und venösen Thrombosen wird vermutet. Allerdings konnte hier auch ein vom Homocysteinspiegel unabhängiger Effekt durch Folsäure beobachtet werden, der möglicherweise auf antioxidativen Eigenschaften über die Aktivierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) beruht (STANGER und WONISCH 2012, ZHOU et al. 2012).

Hinsichtlich des Einflusses des Folatstatus auf neurologische Störungen und kognitive Funktionen liegen bisher keine einheitlichen Ergebnisse vor. Verschiedene Studien konnten zwar Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen niedrigem Folatspiegel bzw. erhöhtem Homocysteinspiegel und einem erhöhten Risiko für kognitive Beeinträchtigungen im fortgeschrittenen Alter (Altersdemenz, Alzheimer-Krankheit) sowie depressiven Störungen liefern, allerdings gibt es auch Untersuchungen die eine solche Beziehung in Frage stellen (MALOUF und GRIMLEY EVANS 2008, BLASKO et al. 2012, CACCIAPUOTI 2012, HINTERBERGER und FISCHER 2013).

Darüber hinaus wird diskutiert, ob Folat aufgrund seiner zentralen Bedeutung für die Nukleotid-Synthese mit dem Auftreten verschiedener Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht werden kann. In zahlreichen epidemiologischen Studien zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen einem adäquaten Folatstatus und dem Risiko für Krebserkrankungen, vor allem bezüglich der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms (GIBSON et al. 2011, STEVENS et al. 2011). In einigen aktuellen Studien wird jedoch eine differenzierte Wirkung von Folsäure auf die kolorektale Karzinogenese propagiert, abhängig von Intensität und Zeitpunkt einer Folsäureintervention (FIFE et al. 2011, NICKEN et al. 2012).

Zusammenfassend betrachtet hat der Folatstatus Einfluss auf zahlreiche gesundheitliche Aspekte, die allerdings zum Teil noch umfassenderer Evidenz bedürfen.

2.1.2.2 Toxische Wirkung

Nach Überdosierung von Nahrungsfolaten oder synthetischer Folsäure konnten bisher keine akuten Intoxikationserscheinungen beobachtet werden. Generell gilt Folsäure als nicht toxisch (NRC 1987). Im Tierversuch wurde an Mäusen für Folsäure eine mittlere letale Dosis (LD_{50}) von 10.000 mg/kg ermittelt, allerdings liegen keine an Tieren durchgeführten Langzeit-Toxizitätsstudien vor (ZAESLEIN 1982). Die chronische Aufnahme hoher Folatmengen kann beim Menschen vereinzelt zu Schlafstörungen, gastrointestinalen Symptomen und mentalen Veränderungen führen, in der Regel werden aber keinerlei Nebenwirkungen beobachtet (HUNTER et al. 1970, HELLSTRÖM 1971, PRAKASH und PETRIE 1982, BUTTERWORTH und TAMURA 1989). Hingegen kann durch eine gesteigerte Folsäurezufuhr eine Cobalamin-Defizienz maskiert werden, die vor allem bei älteren Menschen (> 60 Jahre) auftritt (CAMPBELL 1996). In

diesem Falle können keine veränderten hämatologischen Parameter erhoben werden, allerdings schreitet die Neurodegeneration weiter voran. Beobachtet werden konnte dies aber erst ab einer täglichen Folataufnahme von > 5 mg/d (CZERNICHOW et al. 2005).

Gegenstand der Forschung sind momentan die potenziell kanzerogenen Effekte einer hohen Folsäureaufnahme. In Tierversuchen wurde durch eine moderate Folsäuresupplementation die Entwicklung von Tumoren in normalem Gewebe unterdrückt, demgegenüber aber durch hohe Dosen Folsäure das Voranschreiten prä-existierender Tumore unterstützt (KIM 2003). In einer aktuellen Untersuchung von NICKEN et al. (2012) hatten supraphysiologische Folsäuredosen bei Ratten ebenfalls einen fördernden Effekt auf die Entstehung von Kolonkrebs.

In klinischen Studien ergaben sich bislang keine übereinstimmenden Resultate bezüglich einer konsistenten Beziehung zwischen zusätzlicher Folsäuresupplementation und gesteigertem Krebsrisiko, insbesondere im Konzentrationsbereich unterhalb von 1 mg Folsäure/d (SANJOAQUIN et al. 2005, COLE et al. 2007, MASON et al. 2007, GIBSON et al. 2011, STEVENS et al. 2011).

2.1.2.3 Strategien zur Verbesserung der Folatversorgung

Aufgrund der weit verbreiteten Mangelversorgung mit Folat und den positiven gesundheitlichen Aspekten, die sich aus einem suffizienten Folatstatus ergeben, existieren international verschiedene Ansätze um die Folataufnahme in der Bevölkerung zu optimieren. Im Jahr 1998 wurde zunächst nur in den USA die obligatorische Fortifikation von Nahrungsmittel (Getreide, Mehl) mit Folsäure eingeführt. Über 50 Staaten sind seither diesem Beispiel gefolgt und haben sich ebenfalls diesem Verfahren angeschlossen. In diesen Ländern konnte bereits ein Jahr nach Einführung der Fortifikation eine deutliche Abnahme von NRD bei Neugeborenen beobachtet werden (RAY et al. 2002, HERTRAMPF und CORTES 2008, BELL und OAKLEY 2009).

Vor allem in Europa wird die Anreicherung von Lebensmitteln mit Folaten hingegen nicht favorisiert, insbesondere aufgrund von fehlenden klinischen Daten bezüglich den möglichen gesundheitlichen Risiken einer Langzeitsupplementation mit Folsäure (EICHHOLZER et al. 2006). Allerdings haben alternative Strategien zur Steigerung der Folataufnahme bisher insgesamt wenig Erfolg gezeigt (BUSBY et al. 2005, WALLE und JONG-VAN DEN BERG 2008). Aufklärungskampagnen und andere edukative Maßnahmen erreichen häufig nur einen Teil der Zielgruppe. Insbesondere junge Frauen aus bildungsschwachen Bevölkerungsgruppen werden damit nicht ausreichend erfasst. Das europäische Register für Geburtsdefekte (EUROCAT) berichtet für die meisten europäischen Länder eine signifikant höhere Prävalenz an NRD, verglichen mit Ländern, die Fortifikationsprogrammen durchführen. Die Problematik steht aktuell auch in Deutschland immer wieder zur Diskussion.

2.2 Transportproteine für die Folataufnahme

2.2.1 Folatresorption

Die Mechanismen des Folattransportes über Zellmembranen werden bereits seit fast 5 Jahrzehnten erforscht, da Folate stark lipophile, bivalente Anionen darstellen, die nur sehr schlecht durch Membranen diffundieren können (ZHAO et al. 2009). Dies bedeutet, dass die Aufnahme in die Zelle hauptsächlich durch spezifische Transportproteine (s. u.) erfolgt. Für die Resorption aus dem Darm sind nach heutigem Kenntnisstand insbesondere der Reduced Folate Carrier (RFC, SLC19A1) sowie der Proton-Coupled Folate Transporter (PCFT, SLC46A1) von Bedeutung (s. 2.2.2. und 2.2.3) (BALAMURUGAN und SAID 2006, ZHAO und GOLDMAN 2013). Der Export aus der Zelle wird hingegen über andere Transportproteine der „ATP-Binding Cassette“ (ABC)-Superfamilie realisiert, zu denen unter anderem die Multidrug Resistance-associated Proteins (MRPs/ABCCs), das Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1/ABCB1) und das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) gehören (CHEN et al. 2002, MATHERLY und GOLDMAN 2003, HOOIJBERG et al. 2006). Die Transportaktivität ist dabei gekennzeichnet durch eine niedrige Affinität für Folate und Antifolate, aber eine hohe Transportkapazität (HOOIJBERG et al. 2004, ASSARAF 2006).

Ungefähr 60 - 80 % der in der Nahrung enthaltenen Folate liegen als Polyglutamate vor. Da an der Dünndarmmukosa jedoch nur Monoglutamate absorbiert werden können, müssen diese zunächst durch eine im Bürstensaum der Enterozyten enthaltene zinkabhängige γ -Glutamat-Carboxypeptidase II zu Monoglutamatverbindungen hydrolysiert werden. Resorbiertes Monoglutamylfolat wird in den Mukosazellen durch zwei Reduktionsschritte mittels NADPH₂ in die biologisch aktive Form konvertiert. Der die Umsatzrate limitierende Schritt ist die Umwandlung von Folsäure zu 7,8-Dihydrofolat (DHF) mit Hilfe der Dihydrofolatreduktase. Im nächsten Schritt folgt schließlich die Bildung von metabolisch aktiven 5,6,7,8-Tetrahydrofolat (THF), das teilweise in methylierter (5-MTHF) sowie formylierter (10-Formyl-THF) Form, hauptsächlich jedoch ohne C1-Substituent als freies THF über die Pfortader zur Leber gelangt (PIETRZIK et al. 2008).

Hauptspeicherort der Folate im Körper ist die Leber, die auch die Versorgung der anderen Organe mit Folaten reguliert. Dieser Speicher würde bei folatfreier Ernährung den Folatbedarf für ca. 3 - 4 Wochen decken. Die Elimination von Folaten erfolgt hauptsächlich über den Urin und die Galle, wobei ein Großteil der mit der Galle ausgeschiedenen Folate über den enterohepatischen Kreislauf wieder aufgenommen wird. Auch die mit dem Urin ausgeschiedene Menge ist bei bedarfsgerechter Zufuhr relativ gering (MCPARTLIN 2005).

2.2.2 Reduced Folate Carrier (RFC, SLC19A1)

2.2.2.1 Struktur und Gewebeexpression

Der Reduced Folate Carrier (RFC, SLC19A1) gehört zu den Transportproteinen der „Solute Carrier“ (SLC), die momentan 48 verschiedene Familien mit fast 400 Genen umfassen. Diese Carrier transportieren geladene und ungeladene organische Moleküle sowie anorganische Ionen. Alle Mitglieder einer Familie weisen hinsichtlich ihrer Aminosäurestruktur eine Homologie von mindestens 20 % auf. Neben dem RFC befinden sich in der SLC-Familie 19 noch 2 weitere Mitglieder (SLC19A2, SLC19A3), die Transporter für Thiamin

repräsentieren, welches ebenfalls dem Vitamin B-Komplex zugehörig ist. Im Fall der SLC19-Familie beträgt die Homologie untereinander sogar 55 - 70 % (GANAPATHY et al. 2004).

Im letzten halben Jahrhundert haben sich zahlreiche Studien mit der Aufnahme von Folaten in Säugerzellen beschäftigt und es wurde damals bereits ein spezifischer Transporter vermutet und funktionell charakterisiert (GOLDMAN et al. 1968, ZIMMERMAN 1990). 1995 gelang schließlich die Klonierung der humanen RFC cDNA (WONG et al. 1995, SAID et al. 1996, NGUYEN et al. 1997). Auch von einigen Tierarten wie der Maus (DIXON et al. 1994), der Ratte (HONSCHA et al. 2000) oder dem Hamster (WILLIAMS und FLINTOFF 1995) wurde der Carrier isoliert und die Orthologie mit dem RFC des Menschen bestätigt (KNEUER und HONSCHA 2004). Die primäre Sequenzhomologie zwischen dem humanen RFC und dem Rfc verschiedener Nagetiere beträgt ungefähr 64 – 67 % (KNEUER et al. 2004). In diesem Zusammenhang bezeichnen alle in Großbuchstaben aufgeführten Symbole das humane RFC-Gen bzw. dessen Genprodukt, während diese von anderen Tierarten mit Kleinbuchstaben dargestellt werden.

Seit der ersten Klonierung ist das Wissen über den RFC beständig gewachsen und er konnte als ~65 kDa großes, membranständiges Glykoprotein mit 12 Transmembrandomänen (TMD) charakterisiert werden. Der Rezeptor besteht aus insgesamt 591 Aminosäuren mit nach innen gerichteten Carboxyl- und Amino-Termini und einer großen Verbindungsschleife zwischen den TMDs 1 – 6 und den TMDs 7 – 12 (FERGUSON und FLINTOFF 1999, LIU und MATHERLY 2002). Außerdem besitzt er eine einzelne N-Glykosylierungsstelle in der ersten extrazellulären Schleife, an der es zu unterschiedlich stark ausgeprägten Glykosylierungsvorgängen kommt, wodurch das Protein eine durchschnittliche Molekülmasse von ~85 kDa erreicht (WONG et al. 1998). Diese posttranslationalen Modifikationen scheinen jedoch keine Auswirkungen auf die funktionelle Aktivität des Transportproteins zu haben (MATHERLY und GOLDMAN 2003). Das SLC19A1-Gen besitzt einen offenen Leserahmen mit 7 Exons, davon 5 kodierende Exons und 2 alternative, nicht-kodierende Exons (WILLIAMS und FLINTOFF 1998, ZHANG et al. 1998). Durch die Nutzung dieser alternativen Exons entstehen zudem im Rahmen des sog. „alternativen Spleißens“ verschiedene mRNA-Varianten (WILLIAMS und FLINTOFF 1998). Lokalisiert ist das RFC-Gen des Menschen auf dem Chromosom 21q22.2 (MOSCOW et al. 1995).

Der RFC wird in fast allen Geweben des Menschen exprimiert, allerdings unterscheiden sich die Expressionsraten auf mRNA- und Proteinebene stark. WHETSTINE et al. (2002a) untersuchte 68 verschiedene normale humane Gewebe und 8 humane Tumorzelllinien mit ³²P-markierter cDNA des RFC. Dabei konnte er die höchsten Expressionsraten auf mRNA-Ebene in der Plazenta sowie in der Leber messen, gefolgt von Leukozyten, Lunge, Knochenmark, Niere und Intestinum. Nur geringe Transkriptmengen fand er hingegen in Herz- und Skelettmuskel. Vergleichbare Resultate konnten mit Northern Blot-Untersuchungen, RT-PCR-Analysen sowie Western Blot-Untersuchungen erzielt werden (NGUYEN et al. 1997, GONG et al. 1999, DUDEJA et al. 2001, WHETSTINE et al. 2002a, NABOKINA et al. 2004).

Bei der Ratte stellten sich die Ergebnisse ähnlich dar. Die höchsten Expressionsraten des RFC auf mRNA-Ebene fanden sich in der Niere, aber er konnte auch in der Lunge, der Leber und im Intestinum nachgewiesen werden (HONSCHA et al. 2000). Die Proteinexpression zeigte sich besonders ausgeprägt in der apikalen Membran der Epithelzellen in Dünndarm und Kolon sowie im Plexus choroideus, der basolateralen Membran der Tubulusepithelzellen der Niere und in periportalen Leberzellen (WANG et al. 2001, HINKEN et al. 2011).

2.2.2.2 Regulationselemente

Zu Beginn der Charakterisierung des RFC wurde von zwei alternativen, nicht-kodierenden Exons berichtet mit jeweils einer eigenen Promoterregion, die als Exon A und B bezeichnet wurden (TOLNER et al. 1998, UNAL et al. 2008).

Folgende Studien konnten jedoch mittels der 5' Rapid Amplification of cDNA ends (5'RACE) in Kombination mit RT-PCR zeigen, dass die Promoterregion sehr komplex strukturiert ist. So wurden 7 nicht-kodierende Regionen identifiziert, die in Anlehnung an die oben genannte Bezeichnung die Kürzel A1, A2, C, D, und E tragen und einen Bereich von 35 kb umfassen (WHETSTINE et al. 2002a). Jedoch zeigte sich etwas später in einer weiterführenden Untersuchung, dass A1 und A2 zu einer einzelnen zusammenhängenden A1/A2 Sequenz fusioniert sind (GELLER et al. 2002). Ein alternatives Spleißen konnte bisher für 4 der 6 nicht-kodierenden Regionen beobachtet werden, wobei insgesamt 15 verschiedene 5'-untranslatierte Regionen (5'-UTRs) generiert werden, die zu einer gemeinsamen kodierenden Sequenz fusioniert sind (WHETSTINE et al. 2002a, MATHERLY et al. 2007, PAYTON et al. 2007). Jedoch wurde bisher nur für die 5'-UTRs proximal von Exon A1/A1, A, B und C auch eine Promoteraktivität nachgewiesen (WHETSTINE et al. 2002b, PAYTON et al. 2005).

Nachfolgende Untersuchungen konnten bereits die Regulation einiger Promoter des RFC durch eine große Anzahl an Transkriptionsfaktoren zeigen. Dazu gehören sowohl ubiquitäre (z. B. Sp-Familie, bZIP-Superfamilie, USF-1) als auch gewebespezifische Transkriptionsfaktoren (z. B. Ap2, C/EBP, Ikaros, GATA) (HONSCHA et al. 2000, WHETSTINE et al. 2002b, PAYTON et al. 2005, LIU et al. 2006). Diese haben vermutlich in Kombination mit posttranslationalen Modifikationen wie Methylierungs- und Acetylierungsprozessen einen großen Einfluss auf die gewebsspezifische Expression und Funktionalität des RFC (WHETSTINE et al. 2002b, PAYTON et al. 2005, MATHERLY et al. 2007).

Für die folgende Arbeit von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass der Rfc1 der Ratte in seinem Promoterbereich verschiedene Regulationselemente aufweist, die bisher nur bei fremdstoff-metabolisierenden Enzymen, wie z. B. Cytochrom P450-Isoenzymen gefunden wurden (HONSCHA et al. 2000, HALWACHS et al. 2010). Zu diesen Regulationselementen gehören außerdem die Barbie-Box (barbiturate recognition sequence) und Bindungsmotive für den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), die auch als „Dioxin Response Element“ (DRE) bezeichnet werden (HONSCHA et al. 2000). In einer nachfolgenden Studie zur Regulierbarkeit des Rfc1 konnte bereits gezeigt werden, dass Liganden des AhR zur Herabregulation der funktionellen Rfc1-vermittelten MTX-Transportaktivität in Rattenhepatozyten führen (HALWACHS et al. 2010). Auch für die Barbie-Box stellte sich heraus, dass der RFC darüber reguliert wird (HALWACHS et al. 2007).

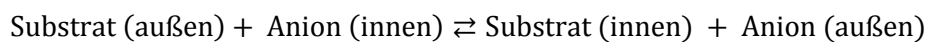
Darauf aufbauend wurde für diese Arbeit mittels einer Transfac-Analyse die Promoterregion des humanen RFC auf DREs untersucht (MATYS et al. 2006). Da WHETSTINE et al. (2002a) im humanen Intestinum nur die Spleißvarianten AIV und DI/DII nachweisen konnte, wurde die Untersuchung auf die Promoterregionen von A und D beschränkt. In beiden Bereichen wurden DREs nachgewiesen. Eine Barbie-Box konnte jedoch nicht identifiziert werden.

2.2.2.3 Eigenschaften der Transportaktivität

Die Eigenschaften des RFC als aktives Transportsystem wurden in vielen Studien charakterisiert (WONG et al. 1998, RAJGOPAL et al. 2001). Dabei fanden die Untersuchungen häufig mit dem als

Chemotherapeutikum eingesetzten Antimetaboliten Methotrexat (MTX) statt, vor allem aufgrund seiner langsamen Metabolisierung und klinischen Bedeutung (GOLDMAN et al. 1968). Physiologisch transportiert der RFC insbesondere reduzierte Folate mit einer hohen Substrataffinität (K_m 2 – 5 μ M), aber einer geringen Transportkapazität (V_{max} 2 - 40 pmol/mg Protein/min) (SIROTNAK und TOLNER 1999, MATHERLY und GOLDMAN 2003). In diesem Bereich ist auch die Aufnahme von MTX zu finden, für andere Antifolate liegt die Substrataffinität aber zum Teil noch höher (GOLDMAN et al. 2010). Die Affinität des RFC für Folsäure ist deutlich niedriger einzustufen (SIROTNAK und TOLNER 1999, WANG et al. 2004).

Der funktionelle Transport durch den RFC wurde als temperatur-, energie- und pH-abhängig charakterisiert, wobei sein pH-Optimum im neutralen Bereich liegt (SAID et al. 1997). Seine Funktionalität scheint nicht direkt mit der ATP-Hydrolyse verbunden zu sein, sondern möglicherweise abhängig vom transmembranen Anionengradienten (HORNE 1993, SIROTNAK und TOLNER 1999, GANAPATHY et al. 2004). Für den MTX-Transport konnte bei neutralem pH-Wert eine Na^+ -Abhängigkeit nachgewiesen werden und der Folattransport scheint H^+ -abhängig zu sein (ZIMMERMAN 1990, KNEUER und HONSCHA 2004). Der Aufnahmemechanismus des RFC ist nicht abschließend geklärt, funktioniert aber möglicherweise als ein aktiver bidirektionaler Antiport mit folgender Reaktionsgleichung (HORNE 1993, GANAPATHY et al. 2004):



Dabei ist der Influx wesentlich höher einzustufen als der Efflux (MATHERLY und GOLDMAN 2003, HOOIJBERG et al. 2006).

2.2.2.4 Bedeutung für die Folataufnahme

Die Muster der Gewebeexpression unterstützen die Annahme, dass der RFC in den verschiedenen Geweben spezialisierte Aufgaben ausführt, wie den transplazentaren Transport von Folaten (SWEIRY und YUDILEVICH 1985), die Folataufnahme über die Blut-Hirnschranke und den Transport in die renalen Tubuli, der über die basolaterale Membran erfolgt (KNEUER et al. 2005).

Allerdings existieren in der Literatur unterschiedliche Meinungen zur Bedeutung des RFC für die intestinale Folataufnahme. Einige Studien weisen klar darauf hin, dass der RFC auch hier den Hauptanteil am Folattransport trägt (CHIAO et al. 1997, KUMAR et al. 1998, DUDEJA et al. 2001, BALAMURUGAN und SAID 2006, MATHERLY et al. 2007). Andere Autoren sind hingegen der Meinung, dass er, obgleich seiner Expression in intestinalen Epithelzellen, in Bezug auf die Aufnahme von Folaten aus dem Darm nur von untergeordneter Bedeutung ist (s. 2.2.3.1).

Die Relevanz des RFC für den Säugerorganismus wird besonders deutlich aufgrund der Tatsache, dass RFC Knock-out Mäuse nicht lebensfähig sind. Die RFC^{-/-}-Tiere versterben dabei bereits im embryonalen Stadium bis spätestens zum 9. Tag. Durch hochdosierte Folsäuregaben an das Muttertier während der Trächtigkeit waren 10 % der Feten lebensfähig, verstarben aber innerhalb der ersten 12 Tage durch ein Versagen des hämatopoetischen Systems (ZHAO et al. 2001).

2.2.3 Proton-Coupled Folate Transporter (PCFT, SLC46A1)

2.2.3.1 Struktur und Gewebeexpression

Erst vor kurzem wurde ein weiteres Transportsystem für Folate, der Proton-Coupled Folate Transporter (PCFT), beim Menschen entdeckt und charakterisiert (QIU et al. 2006, NAKAI et al. 2007, UMAPATHY et al. 2007). Wie auch der RFC gehört der PCFT zu Gruppe der „Solute Carrier“, allerdings zur Familie 46. In dieser befinden sich neben dem PCFT zwei weitere Mitglieder (SLC46A2 und SLC46A3), deren Funktionen zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bekannt sind. Nachfolgend konnte der PCFT auch in verschiedenen Nagetieren nachgewiesen werden (QIU et al. 2007, LAFTAH et al. 2009). Dieser Transporter ist nur ein Beispiel einer Reihe von verschiedenen protonengekoppelten Transportsystemen, die bei niedrigem pH-Wert arbeiten und die intestinale Resorption verschiedenster essentieller Nährstoffe inklusive Vitaminen, Peptiden, Aminosäuren, Metallionen und organischen Anionen vermitteln (FEI et al. 1994, GUNSHIN et al. 1997, BOLL et al. 2002, NOZAWA et al. 2004).

Ursprünglich wurde der PCFT in der Literatur allerdings als pH-unabhängiger Haemcarrier mit niedriger Affinität beschrieben (K_m 125 mM) und als Haem Carrier Protein-1 (HCP-1) bezeichnet (SHAYEGHI et al. 2005). Erst bei Untersuchungen mit dem Antimetaboliten Pemetrexed (PMX), welcher ein spezifisches Substrat für den PCFT ist, stellte sich heraus, dass er zusätzlich bei einem niedrigen pH-Optimum Folate mit hoher Affinität transportiert (WANG et al. 2004).

Das kodierende Gen für den PCFT befindet sich beim Menschen auf Chromosom 17q11.2 (HE et al. 2009). Es besteht aus 5 Exons, die für ein Protein mit 459 Aminosäuren kodieren. In der Proteinsequenz zeigt sich bei Mensch und Maus eine Übereinstimmung von 91 % und zwischen Mensch und Ratte von 87 % (QIU et al. 2007). Zudem konnten eine Glykolisierung an zwei Asparaginresten (N58, N68) nachgewiesen werden. Diese scheinen jedoch wie beim RFC keinen Einfluss auf die Funktionalität, die Proteininstabilität sowie den vesikulären Transport zur Membran zu besitzen (UNAL et al. 2008).

Der humane PCFT wird in vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert. Hohe mRNA-Gehalte findet man in Niere, Leber, Plazenta und Milz, etwas geringere Mengen im Gehirn, Testikeln und Lunge (QIU et al. 2006, ZHAO et al. 2009). Bezüglich des Intestinaltraktes konnte eine hohe Expression in der apikalen Membran von Duodenum und Jejunum (SHAYEGHI et al. 2005, QIU et al. 2006) und eine deutlich niedrigere im Kolon und terminalen Ileum beschrieben werden (URQUHART et al. 2010).

Bei Maus und Ratte konnte eine Expression des PCFT auf mRNA-Ebene bis jetzt in Niere, Leber und mit etwas geringerer Menge in Gehirn, Haut, Lunge und Testikeln gezeigt werden (QIU et al. 2007). Wie auch beim Menschen fand sich bei den intestinalen Geweben besonders viel mRNA im Duodenum und im proximalen Jejunum, im Gegensatz zum distalen Dünndarm und Kolon. Lokalisiert ist das Protein dabei in der apikalen Bürstensaummembran (QIU et al. 2007).

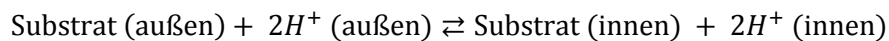
2.2.3.2 Regulationselemente

Aufgrund der kurzen Zeitspanne seit der Entdeckung des PCFT existiert noch relativ wenig Information zur Struktur der Promoterregion. STARK et al. (2009) gelang die erste Charakterisierung von funktionalen Elementen im Bereich bis 157 bp vorgelagert dem Translationsstartcodon. Es wurden als regulatorische Elemente mehrere GC-Boxen sowie Ap-1 und YY1-Elemente identifiziert. Nachfolgende Studien konnten zudem CpG-Inseln sowie NRF-1 Bindungselemente in der Promoterregion nachweisen (GONEN et al. 2008).

Wie auch der RFC wurde der PCFT, in diesem Fall der von STARK et al. (2009) propagierte Bereich des Promotors, auf das Vorhandensein von Bindungsmotiven für den Ah-Rezeptor untersucht. Allerdings wurde in diesem Fall das Webtool JASPER verwendet (MATHELIER et al. 2013). Mittels dieses Programmes konnten auch für den PCFT DREs nachgewiesen werden.

2.2.3.3 Eigenschaften der Transportaktivität

Im Gegensatz zum RFC erfolgt die Aufnahme beim PCFT wahrscheinlich über einen Symport mit mindestens zwei Protonen (YUASA et al. 2009), was in nachstehender Gleichung veranschaulicht ist.



Infolgedessen liegt das pH-Optimum dieses Transporters im sauren Bereich (HENDERSON und STRAUSS 1990, ZHAO et al. 2004a). Bei steigendem pH-Wert sinkt die Transportaktivität, zugleich steigt aber der K_m -Wert für Folsäure, MTX und PMX (ZHAO et al. 2011). Bei vorhandenem pH-Gradienten wurde die funktionelle Aufnahme durch den PCFT als unabhängig vom Membranpotential sowie auch als Na^+ -unabhängig bestimmt (NAKAI et al. 2007). ZHAO et al. (2009) beschrieb jedoch auch eine Transportaktivität in Abwesenheit eines Protonengradienten. Bezüglich des Substratspektrums konnte dem PCFT eine hohe Affinität für Folsäure, 5-Methyltetrahydrofolat (5-MTHF) und 5-Formyltetrahydrofolat (5-FTHF) bei einem pH-Wert von 5.5 nachgewiesen werden ($K_m \sim 0,5 - 5 \mu M$). Die höchste Affinität mit einem K_m -Wert von $\sim 0,09 - 0,8 \mu M$ ergab sich jedoch für PMX (WANG et al. 2004, ZHAO et al. 2004b).

2.2.3.4 Bedeutung für die Folataufnahme

Die Bedeutung des PCFT für die intestinale Folatresorption ist bislang noch unzureichend geklärt. Seit seiner Entdeckung rückt dieser Transporter jedoch vermehrt in den Fokus und einige Autoren schreiben ihm die größere Bedeutung für die intestinale Folataufnahme zu, zum Teil bis hin zur alleinigen Zuständigkeit (YUASA et al. 2009, SHIN et al. 2013). Dies beziehen die Autoren vor allem auf das klinische Bild der sehr seltenen, hereditären Folat-Malabsorption (HFM) des Menschen, die autosomal-rezessiv vererbt wird und bei der eine Funktionsverlustmutation im PCFT-Gen nachgewiesen werden konnte (QIU et al. 2006). Nachfolgend stellte sich heraus, dass ein großes Spektrum an verschiedenen Mutationen im PCFT-Gen zur Symptomatik einer HFM führen (ZHAO et al. 2007, SHIN et al. 2011). Die Betroffenen zeigen unter anderem eine makrozytäre Anämie, Immunsuppression, chronische Diarrhoe und vermindertes Wachstum. Zudem sind häufig verschiedene neurologische Symptome ausgeprägt wie Epilepsie, Gangbildstörungen und periphere Neuropathien. Dies spricht für zwei unterschiedliche Problematiken: Zum einen eine gestörte intestinale Folatresorption und zum anderen ein gestörter Folattransport über den Choroid-Plexus, was sich in geringen Folatspiegeln der cerebrospinalen Flüssigkeit äußert (GELLER et al. 2002, ATABAY et al. 2010). Dies entspricht auch in etwa dem Phänotyp der PCFT Knock-Out Mäuse, die 2010 von SALOJIN et al. (2011) entwickelt wurden. Diese Mäuse wiesen insbesondere hämatologische Störungen in Form einer normochromen, makrozytären Anämie sowie Panzytopenie auf. Unbehandelt verstarben die Jungtiere nach ca. 10 - 12 Wochen. Eine neurologische Symptomatik konnte jedoch nicht beobachtet werden (JACOBSEN 2011).

2.2.4 Folatezeptor α

Folatezeptoren, welche in die Isoformen FR α , FR β und FR γ untergliedert werden, sind Cystein-reiche Glykoproteine, die in der Lage sind, Folate über Endozytose aufzunehmen (CHEN et al. 2013). Dabei besitzen sie, im Gegensatz zum RFC, eine hohe Affinität zu Folsäure ($K_d < 1$ nM) sowie ihrer aktivierten Form 5-MTHF (ANTONY 1992). Die kodierenden Gene für die drei verschiedenen Isoformen werden als FOLR1-3 bezeichnet.

Von den drei genannten Subtypen ist der FR α am häufigsten vertreten, darum wird ihm auch die größte physiologische Relevanz zugeschrieben. Allerdings ist die Expression dieses Rezeptors hauptsächlich auf Zellen beschränkt, die für die embryonale Entwicklung von Bedeutung sind (u. a. Plazenta, Neuralrohr) oder für die Rückresorption von Folaten (Niere). Des Weiteren konnte er auch in Lunge, Schilddrüse und Plexus choroideus nachgewiesen werden. Viele Studien konnten zeigen, dass in diversen entarteten Geweben der FR α hochreguliert wird (WEITMAN et al. 1992, ELNAKAT und RATNAM 2004, NUTT et al. 2010). In intestinalen Zellen konnte er jedoch nicht oder nur mit einer sehr geringen Expression nachgewiesen werden, so dass er für die Aufnahme von Folaten über den Darm nur von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint (WEITMAN et al. 1992, WANG et al. 2005).

2.3 Umweltkontaminanten

2.3.1 Überblick

Wie bereits eingangs erwähnt, ist trotz der Existenz der oben beschriebenen spezifischen Transportproteine der Folatmangel des Menschen insbesondere in Industrieländern wie Deutschland weit verbreitet (BEITZ et al. 2002, OAKLEY 2002, GARCIA-CASAL et al. 2005). Möglicherweise liegt dieser Mangel, zumindest zum Teil, in einer Rezeptor-vermittelten Herabregulation dieser Transportproteine begründet. Denn in der Promoterregion sowohl vom RFC als auch vom PCFT lassen sich DREs finden, die als Bindungsstelle für den AhR dienen. Der AhR ist ein endogener Transkriptionsfaktor, der durch eine Vielzahl von Liganden, darunter auch viele Umweltkontaminanten, aktiviert werden kann.

Unter dem Begriff Umweltkontaminanten versteht man unerwünschte Verbindungen, die hauptsächlich durch industrielle Prozesse in die Umwelt gelangen. Dazu gehören z. B. Schwermetalle wie Cadmium, Thallium, Blei und Quecksilber, Dioxine, polychlorierte Biphenyle, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Lösungsmittel, Arzneimittelrückstände, Pestizide, Mykotoxine und andere Umweltgifte. Viele sind persistent, reichern sich dadurch nach und nach in Luft, Wasser und Boden an und können auch in die Lebensmittelkette gelangen. Die Folgen einer chronischen Exposition gegenüber diesen Verbindungen sind für die Bevölkerung häufig noch nicht hinreichend erforscht (WASI et al. 2013). In der vorliegenden Dissertation von Bedeutung sind die Stoffgruppen der polyzyklischen und halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe, die im Folgenden näher erläutert werden.

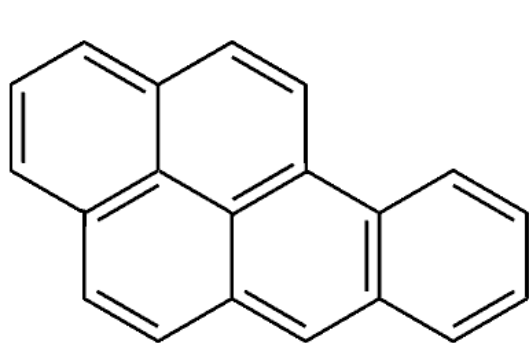
2.3.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Alle Mitglieder dieser großen Stoffklasse sind organische Verbindungen, die aus mindestens zwei miteinander verbundenen aromatischen Ringsystemen bestehen, die immer planar zueinander stehen. Durch die mögliche Addition verschiedener Substituenten an den ringförmigen Kohlenwasserstoffen werden über 300 verschiedene Einzelverbindungen zu den PAK gezählt. Häufig werden sie in niedermolekulare (2 - 3 Ringe) und höhermolekulare (4 - 6 Ringe) eingeteilt, da sie sich in ihren physikalisch-chemischen und toxikologischen Eigenschaften stark unterscheiden. Zur ersten Gruppe gehören Substanzen wie Naphthalin, Phenalen oder Fluoren, zur zweiten Gruppe u. a. Benz[a]anthracen oder Dibenzo[a,h]pyren.

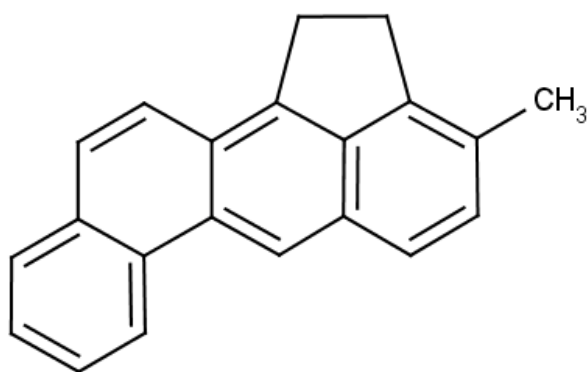
Die US-Umweltbehörde EPA (Environmental Protection Agency) hat bereits in den 80er Jahren eine Liste mit 16 PAK erstellt, die als prioritäre Umweltschadstoffe eingestuft worden sind und häufig stellvertretend für die gesamte Gruppe der PAK in Umweltproben untersucht werden.

Es handelt sich bei den PAK um ubiquitär vorkommende Umweltkontaminanten, die vor allem bei der unvollständigen Verbrennung (Pyrolyse) von organischem Material (wie z. B. Holz, Tabak, Kraftstoff oder Kohle) bei hoher Temperatur (500 – 800 °C) oder bei länger andauernden Prozessen mit einer Temperatur von 100 - 300 °C entstehen. Der überwiegende Teil der in der Umwelt vorhandenen PAK ist heute anthropogenen Ursprungs, hauptsächlich durch die Verbrennung von fossilen Energieträgern (EDWARDS 1983). Aufgrund der ubiquitären Verbreitung können sie in zahlreichen Lebensmitteln nachgewiesen werden, insbesondere in Gemüse sowie in gegrilltem und gebratenem Fleisch (LARSSON et al. 1983, KAZEROUNI et al. 2001). So stellt der Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln neben Tabakrauch und berufsbedingter Exposition auch die Hauptquelle für die Exposition der Bevölkerung mit PAK dar (LIOY et al. 1988, HATTEMER-FREY und TRAVIS 1991, PHILLIPS 1999). Die wöchentliche Aufnahme von B[a]P variiert zwischen 0,01 - 4,0 µg/Person (LIOY et al. 1988, ALEXANDROV et al. 1996).

PAK zeigen im Tierversuch im Allgemeinen eine geringe akute Toxizität. Viele sind jedoch stark kanzerogen und genotoxisch, aufgrund dessen sie schon seit längerer Zeit im Fokus der Forschung stehen. Als Modellsubstanzen finden hier vor allem Benzo[a]pyren (B[a]P) und 3-Methylcholanthren (3-MC) Verwendung. Ihre Strukturformeln sind Abbildung 2 zu entnehmen. B[a]P besteht aus 5 anellierten Benzolringen und ist eines der potentesten und am besten untersuchten Verbindungen aus der Gruppe der PAK. Seine karzinogenen Eigenschaften wurden in zahlreichen Tierversuchen nachgewiesen, aufgrund dessen es häufig als Modellsubstanz in der Forschung verwendet wird (PHILLIPS 1983, SHIMIZU et al. 2000, PLISKOVA et al. 2005). Im 18. Jahrhundert gab es in England eine weit verbreitete Form von Hautkrebs am Skrotum bei Kaminkehrern, den sogenannten Schornsteinfegerkrebs. Man vermutete den permanenten Kontakt mit Ruß und Teer als Auslöser. Jedoch konnte erst 1933 im Tierversuch der Nachweis erbracht werden, dass diese Krebsform durch das im Ruß enthaltene B[a]P ausgelöst wird, nachdem COOK et al. (1933) die Synthese von B[a]P erstmals gelungen war.



Benzo[a]pyren



3-Methylcholanthren

Abbildung 2: Strukturformeln Benzo[a]pyren und 3-Methylcholanthren

B[a]P besitzt die Eigenschaften eines kompletten Karzinogens, es kann also sowohl als Initiator als auch Promoter wirken (BAIRD et al. 2005). Allerdings stellt es ein hydrophobes, chemisch inertes Prokarzinogen dar und muss zunächst enzymatisch in den hochreaktiven Metaboliten Benzo[a]pyren-7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxid umgesetzt werden (KOREEDA et al. 1978). Dies geschieht u. a. über die Phase-I-Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 (s. 2.3.4.2). Epoxide können unter Ausbildung von kovalent verknüpften Addukten mit zellulären Makromolekülen wie DNA und Proteinen reagieren (OSBORNE et al. 1976), dabei bewirken sie das Auftreten von Fehlern in der DNA-Replikation, was zur Induktion eines karzinogenen Prozesses führen kann (DENISSENKO et al. 1996, BAIRD et al. 2005).

3-MC (s. Abbildung 2, rechte Seite) ist ein weiterer Vertreter der PAK, der häufig in der Forschung zum Einsatz kommt (RONIS et al. 2001, JIANG et al. 2009). Der Grundkörper dieser Verbindung ist das Cholanthren. Es hat ein deutlich höheres karzinogenes Potential als B[a]P und wird daher als Standard-Karzinogen verwendet, um bei Modellorganismen maligne Tumoren zu erzeugen (KANE 2006).

2.3.3 Halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK)

Halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (HAK) sind aromatische Kohlenwasserstoffe, bei denen ein oder mehrere H-Atome durch Halogene wie Chlor oder Brom ersetzt wurden. Bei dieser Klasse ubiquitär vorkommender Umweltschadstoffe handelt es sich häufig um planare hydrophobe Moleküle, die primär als Nebenprodukt chemischer Manufakturprozesse und bei der Verbrennung organischer Materialien entstehen (VANDEN HEUVEL und LUCIER 1993). Von besonderem öffentlichen Interesse und toxikologischer Relevanz sind in dieser Substanzklasse die Gruppen der polychlorierten Dibenzo-*p*-dioxine (PCDD) und der polychlorierten Dibenzofurane (PCDF). Sie werden im allgemeinen Sprachgebrauch und in der Literatur als Dioxine zusammengefasst, aber auch häufig mit PCDD/F abgekürzt. Ihre Grundstrukturen sind in Abbildung 3 dargestellt. Sie bestehen aus zwei Benzenringen, die über zwei Sauerstoffatome verbunden sind und vier bis acht Chloratome enthalten, so dass 75 verschiedene Kongenere möglich sind. Die toxischsten Verbindungen sind dabei an Position 2, 3, 7 und 8 chloriert. Häufig werden den Dioxinen noch 12 Substanzen aus der Gruppe der polychlorierten Biphenyle (PCB, z. B. Arochlor) zugerechnet. Sie werden

aufgrund ihres sehr ähnlichen Toxizitätsmechanismus als dioxin-ähnlich bezeichnet, obwohl sie sich strukturell von den Dioxinen unterscheiden (s. Abbildung 3, links unten).

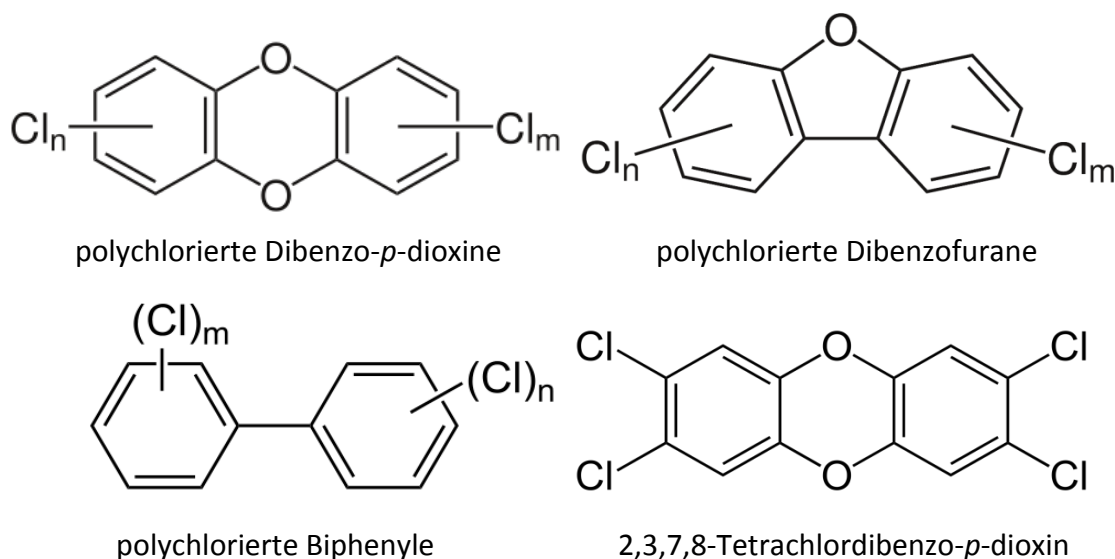


Abbildung 3: Strukturformeln halogener aromatischer Kohlenwasserstoffe

Dioxine gehören zu den am intensivsten untersuchten Stoffklassen der letzten Jahrzehnte, obgleich sie selbst keine kommerzielle Anwendbarkeit besitzen. Sie entstehen hauptsächlich als unerwünschte Nebenprodukte bei industriellen Herstellungsprozessen verschiedener Substanzen und Materialien sowie bei der Verbrennung von kohlenstoffhaltigen Verbindungen in Anwesenheit von organischen oder anorganischen Halogenverbindungen in einem Temperaturfenster von ca. 300 - 600 °C, z. B. bei der Müllverbrennung oder der Herstellung von Pestiziden (OLIE et al. 1977, HUTZINGER et al. 1985, GILPIN und WAGEL 2003). Nur ein sehr kleiner Anteil entsteht bei natürlichen Prozessen wie z. B. Waldbränden (FERRARIO et al. 2000). 1990 wurden für industrielle Verbrennungsanlagen neue Grenzwerte eingeführt, wodurch die Dioxinbelastung durch Müllverbrennungsanlagen in Deutschland heute sehr gering ist. Gegenwärtig machen thermische Prozesse der Metallgewinnung und -verarbeitung und Kleinquellen wie die Abfallverbrennung im Kamin oder im Garten den größten Anteil der Dioxinmissionen aus (BECKER et al. 2011). Allerdings sind Dioxine sehr persistent und werden hauptsächlich über die Luft, gebunden an kleinste Partikel, in der Umwelt verteilt. Sie können ubiquitär nachgewiesen werden, da ein Abbau bei niedrigen Temperaturen kaum stattfindet (BECKER et al. 2011). Sie reichern sich in Böden und Flusssedimenten an und gelangen hauptsächlich auf dem Wege der Anheftung von Bodenpartikeln an Pflanzen in die Nahrungskette (HUTZINGER et al. 1985). Die Aufnahme von Dioxinen erfolgt vor allem über tierische Lebensmittel wie Milch, Eier und Fleisch (WITTSIEPE et al. 2007a), dabei lassen sich aufgrund der außerordentlichen Lipophilie der Dioxine besonders hohe Werte in verschiedenen Fischarten wie Heilbutt, Aal und Dorsch finden (PANDELOVA et al. 2008, WANG und LEE 2010). Nach der Resorption werden sie, gebunden an verschiedene Serumlipide und Lipoproteine, über das Blut im Organismus verteilt und akkumulieren im Fettgewebe sowie in der Leber.

Der bekannteste und toxischste Vertreter der Dioxine ist das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Aufgrund dieser Tatsache hat sich zur Abschätzung der Toxizität der anderen Dioxinverbindungen das Modell der Toxizitätsäquivalente (TEQ) etabliert. Die Wirkungsstärke eines Kongeners wird dabei in

Relation zu der von TCDD durch die Vergabe von sogenannten Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) festgesetzt, wobei TCDD dem Wert 1 entspricht (VAN DEN BERG et al. 1998). Die Toxizität eines Dioxingemisches wird anschließend in Form eines Summenparameters als Toxizitätsäquivalent (TEQ) angegeben. Hierzu wird für jedes im Gemisch enthaltene Kongener die Konzentration mit dem entsprechenden TEF multipliziert und die Werte aller dieser Einzelprodukte aufsummiert. Da die Einstufung durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) durchgeführt wurde, werden die TEQ auch häufig als WHO-TEQ bezeichnet.

Angesichts des ubiquitären Auftretens und der Anreicherung in der Nahrungskette ist es nicht verwunderlich, dass Dioxine bei jedem Menschen nachgewiesen werden können. Allerdings sind die Werte in den Industrieländern deutlich höher (SCHECTER et al. 2006). Dabei beträgt die Halbwertszeit der Dioxine im Menschen ungefähr 7 - 10 Jahre (PIRKLE et al. 1989). Als Indikator für die Hintergrundbelastung des Menschen wird häufig Muttermilch untersucht, da sich darin Dioxine aufgrund des hohen Fettgehaltes leicht anreichern (WITTSIEPE et al. 2007b). Seit den 90er Jahren konnte ein deutlicher Rückgang des Dioxingehaltes um ca. 80 % beobachtet werden, wobei sich dieser Trend in den letzten Jahren deutlich abzuschwächen scheint (WITTSIEPE et al. 2007b). Dabei übersteigt die Gesamtaufnahme von Dioxinen und dioxinähnlichen PCB eines gestillten Säuglings mit 77 pg WHO-TEQ/kg Körpergewicht und Tag immer noch deutlich die von der WHO vorgegebene tolerable Aufnahmemenge von 1 – 4 pg WHO-TEQ/kg Körpergewicht und Tag. AKKAN et al. (2004) schätzen die tägliche durchschnittliche Dioxinaufnahme in Deutschland auf 1,24 - 1,94 pg WHO-TEQ/kg Körpergewicht. Der rückläufige Trend der Dioxinbelastung ist auch in verschiedenen Umweltproben (Bodenproben, Futtermittel) sowie Lebensmittelproben (z. B. Milch, Eier, Fleisch) nachvollziehbar. Allerdings zeigt sich auch hier eine Stagnation seit Ende der 90er Jahre (BECKER et al. 2011).

In den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses gerieten Dioxine und insbesondere das TCDD nach einem Industrieunfall in der norditalienischen Stadt Seveso im Jahre 1976, bei der es in einer Fabrik für die Herstellung von Herbiziden zu einer Explosion kam. Dabei wurden ca. 300 – 2000 g TCDD freigesetzt und auf einer Fläche von etwa 2,8 km² verteilt (HOMBERGER et al. 1979, POHJANVIRTA und TUOMISTO 1994). In der Folge kam es zu einem Massensterben von kleinen Haus- und Wildtieren, die Einwohner mussten evakuiert werden und die kontaminierten Bereiche wurden gesperrt. Noch Jahre später wurden weitreichende Dekontaminationsmaßnahmen im verseuchten Gebiet durchgeführt (HOMBERGER et al. 1979). Zudem hatten sich auch in den Jahren davor zahlreiche Unfälle mit TCDD ereignet, über die jedoch kaum berichtet wurde (SANDERMANN 1974).

Erst seit Seveso sind TCDD und andere Dioxine Gegenstand intensiver Forschung. Obwohl die genauen Mechanismen der Toxizität bis jetzt noch teilweise unklar sind, scheinen die toxischen Effekte über den AhR-Signalweg (s. 2.3.4.1) vermittelt zu werden (MIMURA und FUJII-KURIYAMA 2003). Eine Unterscheidung zwischen akuten und chronischen Effekten gestaltet sich bei Dioxinen relativ schwierig, da die meisten Verbindungen beim Menschen eine Halbwertszeit von Monaten bis Jahren aufweisen, so dass auch nach der Aufnahme einer einzelnen Dosis von einer längerfristigen Exposition ausgegangen werden muss (DEVITO und BIRNBAUM 2003).

Akute Toxizität

Hinsichtlich der toxikologischen Relevanz des TCDD stammen die meisten Erkenntnisse aus tierexperimentellen Studien sowie von einigen Untersuchungen beim Menschen nach Unfällen mit TCDD. Dabei ergab sich in den *in vivo* Studien v. a. in Bereichen von $> 30 \mu\text{g TCDD/kg}$ Körpermasse ein akutes toxisches Potenzial (NEUBERT 1997). Allerdings scheinen die toxischen Effekte der Dioxine eine starke speziesabhängige Variation aufzuweisen. So reichen die ermittelten LD_{50} von $0,6 \mu\text{g/kg}$ beim Meerschweinchen bis hin zu $> 3000 \mu\text{g/kg}$ beim Syrischen Hamster (SCHWETZ et al. 1973, OLSON et al. 1980). Die meisten untersuchten Tierarten wie Affen, Hunde, Kaninchen und Ratten weisen eine LD_{50} zwischen $100 - 300 \mu\text{g/kg}$ auf (DEVITO und BIRNBAUM 2003). Die LD_{50} für den Menschen ist nicht bekannt, allerdings geht man aufgrund von Untersuchungen verschiedener Intoxikationen mit TCDD davon aus, dass sie deutlich höher liegen muss als die des Meerschweinchens (GEUSAU et al. 2001, SCHECTER et al. 2006). Bei allen untersuchten Tierarten ließ sich nach Exposition mit hohen Dosen das sogenannte „Wasting-Syndrom“ beobachten (GASIEWICZ et al. 1980), ein progressiver Gewichtsverlust im Zusammenhang mit massiven Einschmelzungen von Körperfett sowie Muskelschwund (POHJANVIRTA und TUOMISTO 1994). Charakteristisch ist das verzögerte Einsetzen der Wirkung, selbst nach einer mehrfachen LD_{50} tritt der Tod erst nach zwei bis sechs Wochen ein. Als häufige Sektionsbefunde wurden ausgeprägte Thymusatrophien, Leberschäden sowie gastrointestinale Hämorrhagien beschrieben (GASIEWICZ et al. 1980).

Beim Menschen traten akute Vergiftungen nach Unglücksfällen in der Industrie auf. Dabei ergaben sich als typische Symptome Übelkeit und Erbrechen sowie Reizungen der oberen Atemwege (KIMBROUGH et al. 1977). Nach einigen Wochen Latenzzeit kam es in den meisten Fällen zur Ausbildung der typischen Chlorakne, eine schwere Form der zystischen Akne mit hyperplastischen und hyperkeratotischen Veränderungen der Haut, wie zuletzt 2004 beim ukrainischen Politiker Viktor Juschtschenko (GEUSAU et al. 2001, STERLING und HANKE 2005). Ein „Wasting-Syndrom“ konnte beim Menschen nicht beobachtet werden (GEUSAU et al. 2001).

Chronische Toxizität

Bei chronischer Exposition mit subakuten Dosen konnte in tierexperimentellen Versuchen ein breites Spektrum an gesundheitlichen Folgen beobachtet werden (SCHWETZ et al. 1973). Wiederum existieren bezüglich der Toxizität beim Menschen nur wenige Daten. Zu den Effekten, die bisher mit chronischer Dioxinexposition in Verbindung gebracht werden, gehören ein erhöhtes Risiko für verschiedene Tumorerkrankungen (FINGERHUT et al. 1991), Beeinträchtigungen des Immunsystems (WEISGLAS-KUPERUS et al. 2000), verschiedene Hauterkrankungen (KIMBROUGH et al. 1977), Störungen des zentralen und peripheren Nervensystems (GUO und YU 2003), endokrine Erkrankungen wie Entgleisung des Fettstoffwechsels und Diabetes (LONGNECKER und MICHALEK 2000) sowie Schilddrüsenprobleme (PAVUK et al. 2003). Des Weiteren wurden auch von Fortpflanzungsanomalien, teratogenen Effekten und Entwicklungsstörungen berichtet (GUO und YU 2003). In diesem Zusammenhang wird aktuell die mögliche Wirkung der Dioxine als endokrine Disruptoren, also endokrin aktive Substanzen mit schädigender Wirkung, erforscht (CHEN et al. 2010b).

2.3.4 Regulationsmechanismen

2.3.4.1 AhR-Signalkaskade

Es ist schon länger bekannt, dass die toxischen und karzinogenen Effekte der aromatischen Kohlenwasserstoffe hauptsächlich über den AhR-Signalweg vermittelt werden (POLAND und GLOVER 1973, ROWLANDS und GUSTAFSSON 1997, MACDONALD et al. 2004). Dieser Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist ein intrazellulärer ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der erstmals von POLAND und KNUTSON (1982) über Ligandenbindungsanalysen unter Verwendung von radioaktiv markiertem TCDD in der zytosolischen Fraktion der Leber von C75/B6 Mäusen nachgewiesen werden konnte. Der AhR sowie die assoziierten Proteine Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nuklear-Translokator (ARNT) und Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor (AhRR) sind Mitglieder der evolutionär hochkonservierten basic Helix-Loop-Helix (bHLH) PAS Transkriptionsfaktoren (BURBACH et al. 1992, EMA et al. 1992). Die Bezeichnung der PAS-Domäne stellt ein Akronym für die zuerst entdeckten Vertreter dieser Familie PER-ARNT-SIM dar. Die aus *Drosophila* isolierten Proteine PER und SIM sind strukturell homolog und damit eng verwandt mit dem humanen ARNT. Eine PAS-Domäne besitzen insbesondere solche Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Detektion und Anpassung an Umweltveränderungen spielen. Der AhR reguliert als Sensor für xenobiotische (körperfremde) als auch körpereigene niedermolekulare Substanzen die Antwort auf zellulärer Ebene (GU et al. 2000).

Die Bindungsstelle des AhR ist relativ unspezifisch, weshalb neben den aromatischen Kohlenwasserstoffen möglicherweise eine Vielzahl von Substanzen an den AhR binden kann (DENISON und NAGY 2003, ZHAO et al. 2010a). Liganden mit einer hohen Bindungsaffinität sind in der Regel planare oder co-planare, hydrophobe und relativ unpolare Verbindungen mit polyzyklischer Struktur (ADACHI et al. 2001). Das Spektrum der AhR-Liganden umfasst sowohl synthetische und natürliche exogene Verbindungen, als auch Substanzen endogenen Ursprungs (DENISON und NAGY 2003).

Zu den natürlichen AhR-Liganden gehören Verbindungen aus den Substanzklassen der Flavonoide, Indole und Carotinoide, die zumeist pflanzlichen Ursprungs und häufig in Lebensmitteln zu finden sind (ADACHI et al. 2001, AMAKURA et al. 2003, DENISON und NAGY 2003).

Der AhR wurde in fast allen humanen Geweben und in vielen Zelllinien nachgewiesen, allerdings mit sehr unterschiedlichen Expressionsraten. Besonders stark exprimiert wird der AhR in Leber, Lunge und Plazenta (ROBERTS et al. 1986, DOLWICK et al. 1993, HAYASHI et al. 1994).

Er liegt im inaktiven Stadium als Multiproteinkomplex im Zytoplasma vor, in Verbindung mit einem Heat Shock Protein Dimer (HSP90) als Chaperon sowie weiteren Proteinen, die zur Stabilisierung benötigt werden. Wenn ein Ligand in die Zelle gelangt und an den AhR bindet, führt dies zu einer Konformationsänderung und als Folge zu einer Translokation des Komplexes in den Zellkern. Nach Dissoziation der rezeptorassoziierten Proteine kann anschließend im Nukleus die Dimerisierung mit dem ARNT-Protein erfolgen. Dieses Heterodimer stellt den funktionellen Transkriptionsfaktor dar, welcher an spezifischen Enhancersequenzen in der regulatorischen DNA-Region bestimmter Gene binden kann und so zu einer transkriptionellen Regulation dieser Gene führt (OKEY et al. 1979, VRZAL et al. 2004). Inzwischen wurde mit dem AhRR auch ein negativer Feedback-Mechanismus identifiziert, da dieses Protein mit dem AhR um die Bindung und Dimerisierung mit dem ARNT konkurriert. Der AhRR besitzt jedoch im Gegensatz

zum AhR keine Bindungsdomäne für DNA, so dass das Heterodimer aus AhRR und ARNT transkriptionell inaktiv ist (MIMURA et al. 1999, BABA et al. 2001). Einen Überblick über die AhR-Signalkaskade ist in Abbildung 4 zu finden.

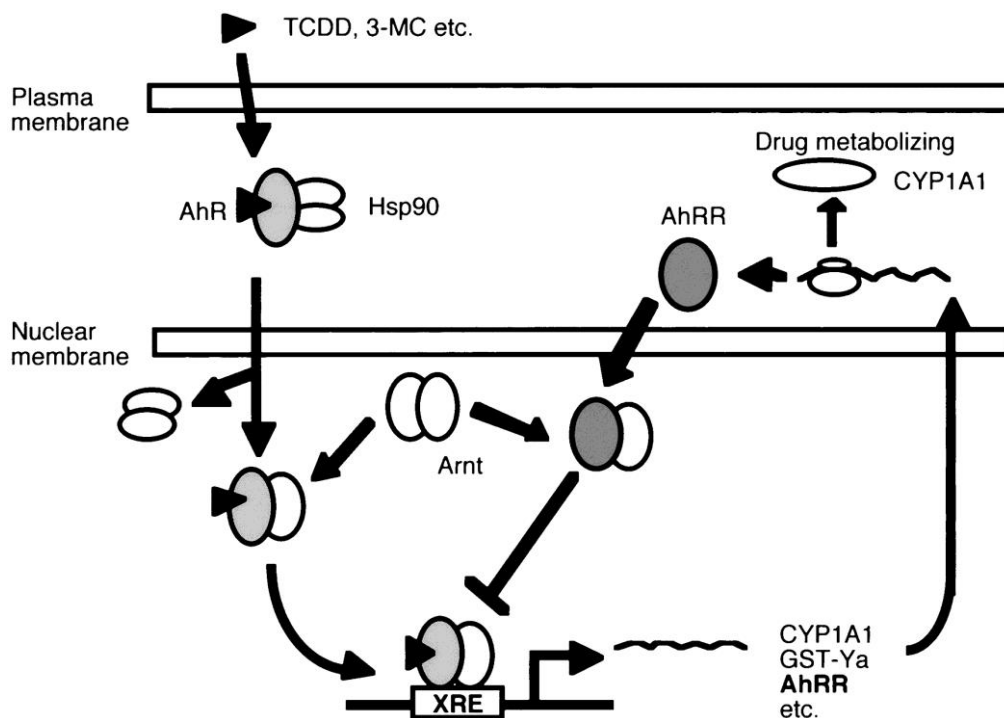


Abbildung 4: Schema AhR-Signalkaskade

Aus: MIMURA et al. (1999)

Die spezifischen Sequenzen, an denen das Heterodimer aus AhR/ARNT bindet, werden als „Xenobiotic Response Element“ (XRE) oder „Dioxin Response Element“ (DRE) bezeichnet. Sie befinden sich in der 5'-Promoterregion verschiedenster Zielgene des AhR, die auch als „AhR gene battery“ zusammengefasst werden (BOCK 1994). Die DREs bestehen aus einer evolutionär hochkonservierten kurzen Kernsequenz mit der Basenfolge 5'-GCGTG-3' und flankierenden Regionen aus jeweils 7 Basen (DENISON et al. 1988, NEBERT et al. 1993, PUGA et al. 2009). Entdeckt wurden sie ursprünglich in fremdstoffmetabolisierenden mitochondrialen Cytochrom P450-Isoenzymen wie zum Beispiel dem CYP1A1 oder 1B1 (s. u.), die in ihrer Promoterregion bis zu 12 DREs enthalten. Inzwischen konnten SUN et al. (2004) und DERE et al. (2011) mittels Mikroarrayanalysen nachweisen, dass sich mehrere tausend potentielle DREs im murinen und humanen Genom befinden. Diese Gene kodieren für die unterschiedlichsten Proteine, die ihre Funktionen in zahlreichen verschiedenen Stoffwechselwegen ausüben.

Nach der Entdeckung des AhR wurde zunächst vermutet, dass er über die Regulation verschiedener CYP P450-Gene hauptsächlich für die Metabolisierung von Xenobiotika relevant ist (POLAND et al. 1976, OKEY et al. 1979). Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre konnten jedoch zeigen, dass der AhR darüber hinaus an zahlreichen physiologischen Stoffwechselwegen und pathologischen Prozessen beteiligt ist, die den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung, die Immun-, und Entzündungsantwort sowie die Morphogenese beeinflussen können (NEBERT et al. 2000, ELFERINK 2003, PUGA et al. 2005, BAROUKI et al. 2007). Die genauen Wirkmechanismen sind bis heute noch nicht endgültig geklärt, jedoch scheint es zu zahlreichen

Interaktionen mit anderen Signalkaskaden und regulatorischen Proteinen wie z. B. dem Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) oder dem Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) zu kommen (HAARMANN-STEMMANN et al. 2009, PUGA et al. 2009). Um den möglichen Einfluss des AhR auf physiologische Aufgaben näher zu untersuchen, haben Mitte der 90er Jahre drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander AhR-defiziente (AhR^{-/-}) Mäuse generiert (FERNANDEZ-SALGUERO et al. 1995, SCHMIDT et al. 1996, MIMURA et al. 1997).

In allen Mäusen konnte eine Störung der Leberentwicklung beobachtet werden. Des Weiteren fand eine Arbeitsgruppe eine hohe postnatale Mortalität, geringere Lymphozytenzahlen in Milz und Lymphknoten sowie Kardiomyopathien und Gefäßfibrosen (FERNANDEZ-SALGUERO et al. 1995, FERNANDEZ-SALGUERO et al. 1997). Allerdings wiesen diese Mäuse auch eine Resistenz gegenüber der durch TCDD vermittelten Toxizität (FERNANDEZ-SALGUERO et al. 1996), wie auch der durch B[a]P vermittelten Karzinogenität auf (SHIMIZU et al. 2000).

Mit der Entwicklung der AhR^{-/-} Mäuse konnten somit Hinweise erbracht werden, dass der AhR neben seiner Rolle für den Stoffwechsel von Xenobiotika viele weitere Funktionen ausübt, deren Komplexität momentan erforscht wird.

2.3.4.2 Cytochrom P450-System

Der AhR ist von zentraler Bedeutung für den Fremdstoffmetabolismus, da er in der Lage ist, die Enzyme des Cytochrom P450-Systems zu aktivieren. Bei diesen mikrosomal lokalisierten Enzymen handelt es sich um eine weit verbreitete Superfamilie von komplexen Hämproteinen, die bisher in allen aerob lebenden Organismen und auch in vielen Anaerobiern nachgewiesen werden konnte (NELSON 1999). Die Zahl 450 im Namen leitet sich von ihrer Eigenschaft ab, Licht mit einer Wellenlänge von 450 nm zu absorbieren, sobald sie sich in einem Komplex mit Kohlenstoffmonoxid befinden. Das P steht hingegen für Pigment, da man zuerst davon ausging, dass es sich bei den CYPs um ebensolche handelt (GARFINKEL 1958). Erst Jahre später konnten OMURA und SATO (1964) sie als Proteine identifizieren. Cytochrom P450-Enzyme spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von Fremdstoffen, denn das Substratspektrum der verschiedenen Familien reicht von lipophilen Stoffen wie Fettsäuren, Retinoiden, Prostaglandinen, biogenen Aminen sowie sekundären Pflanzenstoffen, Pheromone und Xenobiotika bis hin zu Cholesterin, Gallensäuren, Vitamin D und Steroidhormonen (NEBERT und GONZALEZ 1987, NELSON 1999).

Ausgehend von ihrem großen Spektrum hinsichtlich Funktion und Verbreitung sind die CYPs in verschiedene Familien, Subfamilien und Isoformen untergliedert. Die Einteilung orientiert sich dabei an der Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz. Alle Enzyme, die eine Homologie von 40 - 55 % aufweisen, werden einer Familie zugeordnet. Um derselben Subfamilie anzugehören, muss die Übereinstimmung mehr als 55 % betragen. Die zugehörige Nomenklatur wurde von NEBERT und GONZALEZ (1987) entwickelt und 1991 zur heute gültigen Form modifiziert. Es sind aktuell über 260 verschiedene CYP-Familien bekannt, von denen in Säugetieren bisher 69 beschrieben wurden. Die Leber ist das Organ mit dem höchsten Gehalt an Cytochrom P450, jedoch kommen die Enzyme auch in anderen Geweben vor wie dem Gastrointestinaltrakt, der Lunge, der Niere oder auch dem ZNS (NISHIMURA et al. 2003). Als Monooxygenasen (mischfunktionelle Oxidasen) katalysieren die fremdstoffmetabolisierenden Cytochrome unter NADPH-Verbrauch die Phase-I-Reaktion der Biotransformation von zahlreichen endogenen und exogenen Substanzen. In mehreren

Schritten werden dabei energiereiche Elektronen vom Reduktionsäquivalent NADPH auf das Enzym übertragen, was zur Disproportionierung von atmosphärischem O₂ zu Wasser und einem aktivierten Sauerstoffatom führt. Letzteres kann dann in eine Kohlenwasserstoffbindung eines Substrates eingebaut werden, wodurch ein hydroxyliertes Produkt entsteht, dass u. a. in Phase-II-Reaktionen der Biotransformation weiter abgebaut und schließlich ausgeschieden werden kann (WHITE und COON 1980).

Die transkriptionelle Regulation der Cytochrom P450-Enzyme wird über verschiedene Kernrezeptoren vermittelt und erfolgt prinzipiell nach Exposition des Organismus durch endogene oder exogene Substanzen, wobei eine basale Expression zu jeder Zeit gegeben ist (OKEY 1990, WHITLOCK und DENISON 1995, XU et al. 2005). Alle im Metabolismus von Xenobiotika involvierten Cytochrome entstammen dabei der CYP1, CYP2 oder CYP3 Familie (SELISKAR und ROZMAN 2007). Die Expression der CYP1-Familie wird über den bereits erwähnten AhR (s. 2.3.3.1) reguliert. Sie besteht aus 3 Mitgliedern, dem CYP1A1, dem CYP1A2 und dem CYP1B1 (MAUREL 1996), die alle durch verschiedene aromatische Kohlenwasserstoffe induzierbar sind (GONZALEZ et al. 1984, MARIE et al. 1988).

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist das CYP1A1-Isoenzym besonders wichtig, da es primär im extrahepatischen Gewebe lokalisiert ist und eine geringe Grundaktivität im Zusammenhang mit einer starken Induzierbarkeit durch ein breites Spektrum von verschiedenen PAK und HAK zeigt (GONZALEZ 1988, RONIS et al. 2001, NISHIMURA et al. 2003, BIÈCHE et al. 2007). Damit eignet es sich besonders gut zur Untersuchung der AhR-Signalkaskade in extrahepatischem Gewebe. CYP1B1 wird nicht in allen Geweben exprimiert, ist aber unter anderem in Lunge, Niere und Endometrium zu finden (MURRAY et al. 2001). Neben der Metabolisierung von einigen PAK ist dieses Isoenzym auch am Stoffwechsel von Steroiden, Retinoiden und Melatonin beteiligt (SHIMADA et al. 1996). CYP1A2 ist wie die anderen beiden Isoenzyme durch Xenobiotika induzierbar, wird aber fast ausschließlich in der Leber exprimiert (GONZALEZ 1988).

Im Gegensatz zur CYP1-Familie erfolgt die Xenobiotika-medierte Genaktivierung der CYP2 und CYP3 Familie über eine Reihe von Kernrezeptoren, wie den Pregnane X Receptor (PXR), den Constitutive Androstane Receptor (CAR) oder den Glucocorticoid Receptor (GR) in Verbindung mit zusätzlichen Transkriptionsfaktoren (HANDSCHIN und MEYER 2003, URQUHART et al. 2007, PASCUSI et al. 2008). Wie auch der AhR binden diese im aktivierten Zustand an spezifischen „Response Elements“ (RE) im Zielgen und führen zu dessen Expression (MOORE et al. 2006). Infolgedessen kommt es zu einem gesteigerten Metabolismus und Elimination des Induktors, da dieser i. d. R. auch ein Substrat des induzierten Cytochrom P450-Isoenzyms darstellt.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Nach heutigem Kenntnisstand erfolgt die intestinale Folatresorption insbesondere über die Transportproteine RFC und PCFT. Da beide Carrier eine Bindungsstelle für den aktivierten Ah-Rezeptor besitzen, können ubiquitär vorkommende Umweltkontaminanten wie Dioxine und PAK möglicherweise auch an dieser Stelle einwirken und die funktionelle Transporteraktivität regulieren. Tatsächlich konnte in einer Studie an Rattenhepatozyten gezeigt werden, dass TCDD zur Herabregulation des Rfc1 führt (HALWACHS et al. 2010). Da der Rfc1 der Ratte und der RFC des Menschen ortholog sind (KNEUER und

HONSCHA 2004), könnten die Ergebnisse auch auf den Menschen übertragbar sein. Allerdings existieren bezüglich dieser Thematik bisher noch keinerlei Untersuchungen.

Interessanterweise zeigen viele Studien, dass trotz ausreichendem Angebot in der Nahrung viele Menschen besonders in Industrieländern an einem Folatmangel leiden (OAKLEY 2002, GARCIA-CASAL et al. 2005). Somit erscheint es möglich, dass die Folathomoöstase durch verschiedene Umweltkontaminanten wie z. B. TCDD beeinflusst werden kann und als Folge daraus auch eventuell eine Folatmangelsituation entsteht. Es ist darüber hinaus denkbar, dass auch andere Fremdstoffe den RFC beeinflussen, da große planare Strukturen häufig über den AhR-Weg wirken (ADACHI et al. 2001). Der daraus resultierende Folatmangel erhöht das Risiko für bestimmte Erkrankungen wie z. B. Herz- und Tumorerkrankungen und kann zu Missbildungen bei Neugeborenen führen (OAKLEY 2002, WANG et al. 2007, GIBSON et al. 2011). Ein akuter Mangel manifestiert sich primär in Zellen mit hoher Teilungsrage. Als Leitbefund gilt die megaloblastische Anämie (CASTLE 1978).

Ziel der Studie ist es daher, den möglichen Einfluss von ubiquitären Umweltkontaminanten wie TCDD auf die carriervermittelte Folatresorption beim Menschen zu untersuchen. Als Modell dient dabei eine etablierte humane Darmzelllinie.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

3-MC	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Acrylamid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
B[a]P	Serva, Heidelberg, Deutschland
CH-223191	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DOC	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethoxyresorufin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Folsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
³ [H]-Folsäure-Natriumsalz, 40 Ci/mmol	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MES	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Methanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCI	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pemetrexed	Sellekchem, Houston, TX, USA
Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim, Deutschland
Raltitrexed	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Resorufin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Rotiszint® eco plus	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salicylamid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Silikonöl, 20 cSt Polydimethylsiloxan	Caesar & Lorentz, Hilden, Deutschland
Silikonöl, 200 cSt Polymethylphenylsiloxan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
TCDD	AccuStandard, New Haven, CT, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Toluen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypton	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
WST-1-Tetrazoliumsalz	Roche, Mannheim, Deutschland

Alle weiteren gebräuchlichen Chemikalien wurden in der höchstmöglichen Qualität von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

3.1.2 Puffer und Lösungen

³[H]-Folsäure 20 µM (Heiß-Kalt-Gemisch für die radioaktiven Aufnahmeversuche)

³ [H]-Folsäure, Natriumsalz	2 x 10 ⁷ dpm	9,00 µl
(Konzentration 1 mCi/ml, spez. Aktivität 40 Ci/mmol)		
Folsäure (10 mM in 1 M NaOH)	2000 µM	200 µl
Krebs-Ringer-Puffer, pH 5.5 (s. u.)		ad 1000 µl
Lagerung bei -20 °C		

Zum Teil wurden auch andere Folsäurekonzentrationen im Heiß-Kalt-Gemisch verwendet. Dementsprechend erfolgte eine Anpassung der Berechnung.

5X Probenpuffer (modifiziert nach LAEMMLI (1970))

TRIS-HCL, pH 6.8	39,27 g/L	250 mM
Glycerin	23 ml (87 %)	50 % (v/v)
SDS	40,0 g/L	4 % (w/v)
Bromphenolblau	5,0 g/L	0,5 % (v/v)
ad 40 ml Aqua bidest		

Alkalische Lyse Puffer I

Glucose	9 g/L	50 mM
EDTA	2,9 g/L	10 mM
TRIS-HCl, pH 8.0	3,93 g/L	25 mM
ad 100 ml bidest, autoklaviert		

Vor der Verwendung wurde Lysozym (4 mg/ml) hinzugefügt.

Alkalische Lyse Puffer II

NaOH	8 g/L	200 mM
SDS	10 g/L	1 % (w/v)
ad 100 ml Aqua bidest		

Alkalische Lyse Puffer III

Kaliumacetat	30 g/L	3 M
Eisessig	40 ml	40 % (v/v)
ad 100 ml Aqua bidest		

Krebs-Ringer-Puffer (modifiziert nach LEMOS et al. (2007))

NaCl	7,20 g/L	123 mM
KCl	0,37 g/L	4,93 mM
MgSO ₄	0,30 g/L	1,23 mM
CaCl ₂	0,12 g/L	0,85 mM
D-Glucose	0,90 g/L	5 mM
Glutamin	0,73 g/L	5 mM
MES	3,90 g/L	20 mM

Es wurde eine 10X Salzlösung (Stock) hergestellt, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Der Puffer wurde immer frisch angesetzt. Dazu wurde der Stock 1:10 mit Aqua bidest verdünnt und Glucose, Glutamin und MES hinzugegeben. Mit 1N NaOH wurde der pH-Wert auf 5.5 eingestellt.

Laufpuffer

Tris-Base, pH 8.3	3,02 g/L	25 mM
Glycin	14,4 g/L	192 mM
SDS	1,0 g/L	0,1 % (w/v)

LB-Agar (1,5 %)

LB-Medium (pH 7.0)		500 ml
Agar-Agar	7,5 g/L	1,5 % (w/v)
Ampicillin	50 µg/ml	143 µM

LB-Medium

Trypton	10 g/L	1 % (w/v)
Hefeextrakt	5 g/L	0,5 % (w/v)
NaCl	5 g/L	0,5 % (w/v)

ad 1 L Aqua bidest, pH-Wert 7.0 (1N HCl)

Natriumacetat-Puffer

Natriumacetat	13,61 g/L	100 mM
ad 100 ml Milli-Q-Wasser, pH 4.5 (konz. HCl)		

PBS

NaCl	8,01 g/L	137 mM
KCl	0,20 g/L	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	0,22 g/L	1,6 mM
Na ₂ HPO ₄	1,52 g/L	8 mM

ad 1 L Aqua bidest

RIPA-Puffer

NaCl	8,75 g/L	150 mM
TRIS-HCl, pH 7.4	7,85 g/L	50 mM
SDS	1,0 g/L	0,1 % (w/v)
DOC	5,0 g/L	0,5 % (w/v)
Triton-X-100	1 ml (100 %)	1 % (v/v)

ad 100 ml Aqua bidest

Sammelgelpuffer

TRIS-HCl, pH 6.8	60,56 g/L	500 mM
SDS	4,0 g/L	0,4 % (w/v)

ad 1 L Aqua bidest

SOC-Medium

Trypton	20,00 g/L	2 %
Hefeextrakt	5,00 g/L	0,5 %
NaCl	0,58 g/L	10 mM
KCl	0,19 g/L	2,5 mM
MgCl ₂ (Hexahydrat)	2,03 g/L	10 mM
MgSO ₄ (wasserfrei)	1,20 g/L	10 mM
Glucose	3,60 g/L	20 mM

ad 1 L Aqua bidest, Glucose + MgCl₂ + MgSO₄ nach Autoklavieren zugegeben

TBE-Laufpuffer (10X)

Tris	108 g/L	10 mM
Borsäure	55 g/L	44,5 mM
Natrium-EDTA	9,6 g/L	1,3 mM

ad 1 L Aqua bidest, pH 8.3

TBS

NaCl	8,75 g/L	150 mM
Tris-HCl, pH 7.5	1,21 g/L	7,7 mM

ad 1 L Aqua bidest

TBST

TBS (s. o.)	500 ml	
Tween 20	10 ml (10 %)	0,05 % (v/v)

Transferpuffer

Tris-Base, pH 8.3	3,03 g/L	25 mM
Glycin	14,4 g/L	192 mM
Methanol	200 ml (100 %)	20 % (v/v)
ad 1 L Aqua bidest		

Trenngelpuffer

Tris-HCL, pH 8.8	181,7 g/L	1500 mM
SDS	4,0 g/L	0,4 % (w/v)
ad 1 L Aqua bidest		

3.1.3 Geräte

Elektrophorese

Blotkammer Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell

BioRad, München, Deutschland

Elektrophoresekammer GNA 100

Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Horizontalgelkammer Wide Mini-Sub Cell GT

BioRad, München, Deutschland

kleine Horizontalgelkammer

Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig,
Leipzig, Deutschland

Spannungsgeber Power PAC 200

BioRad, München, Deutschland

Spannungsgeber Power PAC 1000

BioRad, München, Deutschland

Vertikalgelkammer Mini-PROTEAN 3

BioRad, München, Deutschland

Software

iCycler iQ Real Time Detection System

BioRad, München, Deutschland

GraphPad Prism 4

GraphPad Software, La Jolla, CA, USA

Lasergene 6.0

DNASTAR Inc., Madison, WI, USA

SigmaPlot 11.0

Systat Software, San Jose, CA, USA

Spektrophotometer

BioPhotometer Plus

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tecan Genios Reader

Tecan, Crailsheim, Deutschland

Tecan Spectra Rainbow Thermo

Tecan, Crailsheim, Deutschland

Thermocycler

GeneAmp PCR System 9700

Applied Biosystems; Darmstadt, Deutschland

Mx3000P

Stratagene, La Jolla, CA, USA

Waagen

Laborwaage BL610	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage TE153s	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Zentrifugen

Biofuge 28 RS	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sorvall Evolution RC	Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Deutschland
Tischzentrifugen 5414 C, 5415 D, 5417 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Universal 320	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Sonstige Geräte

Autoklav 3870 ELV	Systec, Wettenberg, Deutschland
Digitalkamera Powershot G5	Canon, Krefeld, Deutschland
Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500	Beckmann, Fullerton, CA, USA
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Plattformschüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, München, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe® HS	Heraeus, Hanau, Deutschland
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wippschüttler ProBlot Rocker 25	Labnet, Edison, NJ, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

3.1.4 Materialien für die Molekularbiologie und Proteinbiochemie

Antikörper

Goat polyclonal anti-Mouse IgG, AP Conjugate	Promega, Madison, WI, USA
Goat Polyclonal anti-Rabbit Immunoglobulins/AP	Dako, Glostrup, Deutschland
Mouse Polyclonal anti ACTB	clone AC-15
Rabbit Polyclonal anti-SLC19A1	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit Polyclonal anti-SLC46A1	Biozol, Eching, Deutschland

E. coli-Stamm

NEB 5-alpha F' I ^q	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
-------------------------------	---

Enzyme

DreamTaq PCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
DNase	Qiagen, Hilden, Deutschland

Lysozym	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PCR Master Mix (2X)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
RiboLock™ RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid Reverse Transcriptase	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
RNase A	Roche, Mannheim, Deutschland

Kits

BCA-Assay-Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
CloneJET PCR Cloning Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

Standards für Molekulargewichte

100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
MassRuler Express Reverse DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
peqGOLD Protein-Marker IV	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

Primer

Tabelle 2: Primer für die RT-PCR

Die Zahl im Namen der Primer bezieht sich auf die Position der Primer in der NCBI-Sequenz (s. u.).

Primer	5'-3'-Sequenz	Tm (°C)	GC-Gehalt (%)	PCR-Fragment (bp)
hRFC_1577F	CCGCGGAGGAGAAGGCAGCACA	67,7	68,2	496
hRFC_2073R	GCGGCACAGGGCAGGGGGAATC	69,6	72,7	
hPCFT_1455F	AAGCCCAGCCCACAGCAGGACAAG	67,8	62,5	471
hPCFT_1926R	CCCCAACCACAGCAAAGGCAACAC	66,1	58,3	
hFOLR1_315F	ACGGCATTTCATCCAGGACACCTGC	66,3	56,0	575
hFOLR1_890R	AGAGGCCCCGACCATGGAGCAGGAAC	69,5	64,0	
hACTB_215F	TGGTGGGCATGGGTCAGAAG	61,4	60,0	421
hACTB_636R	GTCCCGGCCAGCCAGGTCCAG	69,6	76,2	
hABCB1_1800F	ACAGTCCAGCTGATGCAGAGG	61,8	57,1	421
hABCB1_2220R	CCTTATCCAGAGCCACCTGAAC	62,1	54,5	
hABCG2_1532F	GCTGAATTACATCAACTTCCGGGGGTGA	66,7	48,3	767
hABCG2_2276R	GGATTGTTTCCTGTTGCATTGAGTCCTGG	66,7	48,3	
hABCC1_2067F	GAGCTGGAACCTGACAGCAT	59,4	55,0	424
hABCC1_2490R	CCTTCTCGCCAATCTCTGTCC	61,8	57,1	
hABCC2_3573F	CCAATCTACTCTCACTTCAGCG	60,3	50,0	472
hABCC2_4054R	AGATCCAGCTCAGGTCGGTACC	64,0	59,1	
hABCC3_3511F	TCTATGCAGCCACATCACGG	59,4	55,0	477 bzw. 328
hABCC3_3987R	GTCACCTGCAAGGAGTAGGACAC	64,2	56,5	

hABCC4_2959F	TGTTTTTGACAACGTCCCGCT	57,9	47,6	416
hABCC4_3335R	TCCGGTCTTCCCACAATGC	59,4	55,0	
hABCC5_641F	CTAGAGAGACTGTGGCAAGAAGAGC	64,6	52,0	479
hABCC5_1119R	AAGATGGCAACAACGGGTCC	59,4	55,0	
hABCC6_318F	GCTTGATTGCGCCCTCATAGT	59,8	52,4	563
hABCC6_880R	CACTGCGGTTCTCATCCAC	61,4	60,0	

Tabelle 3: Primer für den Mykoplasmentest

Primer	5'-3'-Sequenz	Tm (°C)	GC-Gehalt (%)	PCR-Fragment (bp)
MycoFOR1	CGCCTGAGTAGTACGTTCGC	61,4	60,0	~510
MycoFOR2	CGCCTGAGTAGTACGTACGC	61,4	60,0	
MycoFOR3	TGCCTGAGTAGTACATTCGC	57,3	50,0	
MycoFOR4	TGCCTGGGTAGTACATTCGC	59,4	55,0	
MycoFOR5	CGCCTGGGTAGTACATTCGC	61,4	60,0	
MycoFOR6	CGCCTGAGTAGTATGCTCGC	61,4	60,0	
MycoREV1	GCGGTGTGTACAAGACCCGA	61,4	60,0	
MycoREV2	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	59,4	55,0	
MycoREV3	GCGGTGTGTACAAAACCCGA	61,4	60,0	

Tabelle 4: Primer für die qRT-PCR

Die Zahl im Namen der Primer bezieht sich auf die Position der Primer in der NCBI-Sequenz (s. u.). Das Wort „probe“ im Namen weist darauf hin, dass es sich um die Sonde handelt (s. 3.2.2.6).

Primer	5'-3'-Sequenz	Tm (°C)	GC-Gehalt (%)	PCR-Fragment (bp)
hRFC_1372F	GCCACCATCGTCAAGACCATC	61,8	57,1	136
hRFC_1508R	AGCATGGCCCCCAAGAAGTAG	61,8	57,1	
hRFC_probe	CCCGGTCCGCAAGCAGTTCAGTTA	67,9	60,0	-
hPCFT_744F	GATAGCCATGACTCTCTATGCAGC	62,7	50,0	121
hPCFT_867R	GGCGGGAGCCACATAGAGCT	63,5	65,0	
hPCFT_probe	GCCAAAGTCCACCCGGCTCTTCAC	67,8	62,5	-
hACTB_698F	AGCGGGAAATCGTGCGTGAC	61,4	60,0	138
hACTB_835R	CAATGGTGATGACCTGGCCGT	61,8	57,1	
hACTB_probe	CACGGCTGCTTCCAGCTCCTCCC	69,6	69,6	-

Tabelle 5: Primer für die Klonierung

Die Zahl im Namen der Primer bezieht sich auf die Position der Primer in der NCBI-Sequenz (s. u.).

Primer	5'-3'-Sequenz	Tm (°C)	GC-Gehalt (%)	PCR-Fragment (bp)
hRFC_1170F	CGCGGGCGTCACGGCCACGCAG	73,3	81,5	570
hRFC_1739R	GGGGCCTGGGCCAGGTATGGGTCTG	73,0	75,0	

hPCFT_542F	CCCTCCTCGGCGACTTCGGTGGCC	73,0	75,0	779
hPCFT_1236R	GTTGAAGATGCCGGAGGCCGTCAG	67,8	62,5	

Die Primer wurden von folgenden Sequenzen (GenBank, NCBI) abgeleitet:

hRFC: NM_194255.2
hPCFT: BC010691
hFOLR1: NM_000802.3
hACTB: NM_001101.3
hABCB1: AF016535.1
hABCG2: AY017168.1
hABCC1: NM_004996.3
hABCC2: NM_000392.3
hABCC3: AF085691.1/AF009670.1
hABCC4: AY081219.1
hABCC5: AB076622.1
hABCC6: NM_001171.5

Die Primer für die Untersuchung auf Mykoplasmen (s. Tabelle 3) wurden der Publikation von UPHOFF und DREXLER (2002) entnommen.

Die Synthese aller Primer erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

Restriktionsenzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme HindIII, NheI, NotI und StuI wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) bezogen.

weitere Materialien

96-Well-Platten für die qRT-PCR	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Extra Thick Plot Paper	BioRad, München, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Gel loading dye	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Selektionsantibiotikum Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Protran Nitrocellulose Transfer Membran	Whatman, Maidstone, Kent, UK
Western Blue Stabilized Substrate for AP	Promega, Madison, WI, USA

3.1.5 Materialien für die Zellkultur

Verbrauchsmaterialien

2,0 ml Eppendorfgefäße	Dr. Ilona Schubert, Leipzig, Deutschland
96-Well-Platten	Dr. Ilona Schubert, Leipzig, Deutschland
400 µl Zentrifugenröhrchen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mini Vials B	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Alle übrigen Einmalartikel wurden von der Firma Greiner (Frickenhausen, Deutschland) bezogen.

Kulturmedien und Zusätze

β-Glucuronidase/Arylsulfatase	Roche, Mannheim, Deutschland
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dicoumarol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DMEM/Ham's F12	PAA, Cölbe, Deutschland
Ethoxyresorufin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
FCS	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Glutamin	PAA, Cölbe, Deutschland
MEM with Earle's Salts	PAA, Cölbe, Deutschland
NEAA	PAA, Cölbe, Deutschland
Pen/Strep	PAA, Cölbe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin/EDTA (1X)	PAA, Cölbe, Deutschland
Trypsin/EDTA (10X)	PAA, Cölbe, Deutschland

Zelllinie

Die Zelllinie LS180 (Nr. 87060401) wurde von der ECACC (European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, UK) mit der Passage 52 erworben. Diese Zellen entstammen einem humanen Adenokarzinom des Kolon.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Kultivierung

Sämtliche Arbeiten im Zellkulturbereich wurden grundsätzlich unter aseptischen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit Laminarflow durchgeführt. Die permanente Kultur der als Monolayer wachsenden LS180-Zellen erfolgte bei 37 °C und Carbogen (5 %) in einem Begasungsbrutschrank unter Verwendung von T75-Zellkulturflaschen. Das Wachstum und der Zustand der Zellen unterlagen dabei einer regelmäßigen mikroskopischen Kontrolle. Zusätzlich wurden die LS180-Zellen in regelmäßigen Abständen mittels RT-PCR auf eine Kontamination mit Mykoplasmen (s. 3.1.4 und 3.2.2.4) untersucht. Dieser Test fiel immer negativ aus. Der Mediumwechsel der kultivierten LS180-Zellen erfolgte alle 2 - 3 Tage. Als Medium diente dabei MEM with Earle's salts, supplementiert mit 2 mM Glutamin, 1 % NEAA und 10 % FCS. Alle in der Zellkultur verwendeten Materialien und Lösungen wurden vorher autoklaviert bzw. sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µM).

Passagierung

Die LS180-Zellen wurden alle 5 - 7 d bei einer Konfluenz von 80 - 90 % passagiert. Dafür wurde zunächst das alte Medium entfernt und anschließend ein zweimaliger Waschschrift mit ca. 10 ml PBS durchgeführt. Um

die Zellen zu vereinzeln und vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen, wurden sie anschließend 1 ml Trypsin/EDTA (1X) ausgesetzt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 10 - 15 min im Brutschrank wurde 10 ml neues Medium für die Inaktivierung des Trypsins hinzugegeben und die Zellen darin durch vorsichtiges auf- und abpipettieren resuspendiert. Für eine neue Passage wurden 0,5 – 1 ml dieser Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit dem vorgelegten neuen Medium (ad 10 ml) vermischt. Um eine Überalterung der Zellen und damit einen möglichen Einfluss auf die Experimente zu vermeiden, fanden die Zellen grundsätzlich nur bis Passage 75 Verwendung.

Kryokonservierung

Als Medium für die Kryokonservierung diente MEM-Medium, versetzt mit 10 % DMSO sowie 10 % FCS und anschließender Sterilfiltration. Die LS180-Zellen wurden wie gewohnt trypsiniert und anschließend ausgezählt (s. u.). Im Anschluss wurden 5×10^6 Zellen nach der Zentrifugation (6 min, 2000 rpm, 4 °C) mit 1 ml Einfriermedium versetzt und in ein gekühltes Kryoröhrchen überführt. Nach 1 - 5 Tagen Lagerung bei -70 °C wurden die Kryoröhrchen für eine längerfristige Aufbewahrung der Zellen in einen Einfriertank mit flüssigem Stickstoff verbracht.

Um gelagerte LS180-Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden die Kryoröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und die Zellen zügig in eine Kulturflasche mit 25 ml warmen Medium überführt und resuspendiert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels Eingabe eines Tropfens Zellsuspension in eine Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm). Vier Quadrate wurden unter dem Mikroskop ausgezählt, deren Mittelwert multipliziert mit 10^4 die Zellzahl/ml ergibt.

Bestimmung der Zellvitalität mittels Trypanblau

Für die Vitalfärbung fand der anionische Diazofarbstoff Trypanblau Verwendung, da er von Zellen mit einer intakten Membran nicht aufgenommen wird. Tote oder perforierte Zellen färben sich dagegen tiefblau an und ermöglichen eine mikroskopische Auswertung. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension je nach Zelldichte mit Trypanblau (1 % (v/v) Trypanblau in PBS) verdünnt (1:2 bis 1:10) und in einer Neubauer Zählkammer das Verhältnis vitaler Zellen zur Gesamtzellzahl ermittelt.

3.2.1.2 Bestimmung der Zellviabilität in LS180-Zellen mittels WST-1-Test

In dieser Arbeit kamen verschiedene Substanzen zur Verwendung, deren Toxizität für die LS180-Zellen zunächst im WST-1-Test (water soluble tetrazolium) überprüft wurde. Dabei wird als Maß für die Vitalität der Zellen die metabolische Aktivität genutzt. Nur durch die intakte Atmungskette in lebenden Zellen kann das chromogene Tetrazoliumsalz WST-1 von intrazellulär lokalisierten mitochondrialen Succinatdehydrogenasen zu dem dunkelroten wasserlöslichen Formazan reduziert werden. Die enzymatisch umgesetzte Menge des Farbstoffes kann spektrophotometrisch bestimmt werden und korreliert direkt mit der Anzahl der viablen, metabolisch aktiven Zellen.

Für die Durchführung des WST-1-Tests wurden am Vortag LS180-Zellen auf 96-Well-Zellkulturplatten mit einer Dichte von $7,5 \times 10^4$ Zellen/ml ausgesät. Anschließend erfolgte nach Zugabe der zu testenden

Substanzen in definierten Konzentrationen (als 6-fach Bestimmung) die Inkubation im Brutschrank für 72 h. Zusätzlich wurde eine Lösungsmittelkontrolle in der höchsten eingesetzten Konzentration untersucht. Sie betrug bei allen Substanzen maximal 1 %. Des Weiteren dienten unbehandelte Zellen als Positivkontrolle sowie mit Triton (0,1 % (v/v) Triton-X 100 in PBS) versetzte Zellen als Negativkontrolle.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und anschließend 200 µl des 1:20 im MEM-Medium verdünnten WST-1 zu jedem Ansatz pipettiert. Die Bestimmung der Absorption bei 450 nm zum Zeitpunkt $t = 0$ und $t = 30$ min erfolgte mittels Spektrophotometer. Die Viabilität der Zellen wurde durch die Berechnung der zeitlichen Differenz ($t_{30} - t_0$) unter Einbeziehung der Hintergrundabsorption ermittelt und prozentual auf die unbehandelten Zellen (100 %) bezogen.

3.2.1.3 Vorbehandlung der LS180-Zellen mit Cytochrom P450-Induktoren

Um den Einfluss von polyzyklischen und halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen auf die enzymatische Aktivität von CYP1A1 (EROD), den funktionellen Folsäuretransport und die mRNA-Expression verschiedener Transporter zu überprüfen, wurden die LS180-Zellen mit definierten Zellzahlen (s. jeweiliges Kapitel) ausgesät und nach einer Ruhephase von 24 h die jeweiligen Substanzen zugesetzt (s. Tabelle 6). Die Auswahl der Konzentrationen orientierte sich dabei an den Ergebnissen im Zellviabilitätstest (s. 3.2.1.2) sowie Literaturquellen. Die Lagerung der Substanzen erfolgte als Stocklösungen bei -20 °C. Um die gewählte Endkonzentration der Substanzen für die Induktion zu erreichen, wurden sie in frischem supplementierten MEM-Medium gelöst, wobei der Lösungsmittelgehalt nie 0,1 % überstieg. Des Weiteren erfolgte jeden Tag ein Mediumwechsel, um eine gleichbleibende Substanzkonzentration zu gewährleisten. Bei jedem Versuchsansatz wurde auch immer eine Gruppe unbehandelter Kontrollzellen mitgeführt.

Tabelle 6: Schema für die Vorbehandlung der LS180-Zellen mit Cytochrom P450-Induktoren sowie AhR-Antagonisten

	Vorbehandlung der LS180-Zellen für die jeweiligen Versuche (Substanzkonzentration, Inkubationsdauer)		
Substanz	EROD	Aufnahme mit ^3H -Folsäure	qRT-PCR (RFC, PCFT)
TCDD	0,01 – 10 nM 12 – 96 h	1 oder 10 nM 24 – 120 h	1 oder 10 nM 24 – 120 h
B[a]P	0,01 – 1 µM 12 – 72 h	0,1 oder 1 µM 24 - 120 h	0,1 oder 1 µM 24 – 120 h
3-MC	0,01 – 10 nM 12 – 72 h	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt
Vor einer Inkubation mit TCDD oder B[a]P erfolgte z. T. eine Präinkubation mit AhR-Antagonisten			
Salicylamid	Nicht durchgeführt	250 oder 500 µM 2 h vor Zugabe TCDD/B[a]P	250 oder 500 µM 2 h vor Zugabe TCDD/B[a]P
CH-223191	Nicht durchgeführt	1 oder 10 µM 2 h vor Zugabe TCDD/B[a]P	1 oder 10 µM 2 h vor Zugabe TCDD/B[a]P

3.2.1.4 Messung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylaseaktivität (EROD)

Der EROD-Assay dient zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1), einem komplexen, mikrosomal lokalisierten Hämprotein, dass in unterschiedlichen Geweben exprimiert wird und über eine Monooxygenase zur Biotransformation von Endo- und Xenobiotika beitragen kann. Verschiedene Substanzklassen, wie zum Beispiel die polychlorierten Kohlenwasserstoffe oder die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, können CYP1A1 über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) aktivieren (HAMMOND und STROBEL 1992). Über die quantitative photometrische Bestimmung von Resorufin, dessen Bildung aus 7-Ethoxyresorufin hauptsächlich durch CYP1A1 katalysiert wird, kann die Aktivität des Enzyms Ethoxyresorufin-O-deethylase ermittelt werden. Über diesen Wert lässt sich anschließend indirekt die Höhe der CYP1A1-Induktion ableiten (RODRIGUES und PROUGH 1991).

In dieser Arbeit fand ein modifiziertes Protokoll nach DONATO et al. (1993) Verwendung. Dazu wurden LS180-Zellen in 24-Well-Platten in einer Zellzahl von 7×10^4 Zellen/ml ausgesät. Zusätzlich wurde der photometrische Leerwert bestimmt. Nachdem die Zellen 24 Stunden ruhen konnten, wurden die entsprechenden Substanzen in definierten Konzentrationen hinzugeben (s. Tabelle 6) und die Platten über 12 - 96 h im Brutschrank inkubiert. Zum Starten der Aktivitätsmessung wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und anschließend 200 µl Assaymedium in jedes Well pipettiert. Das Assaymedium bestand aus serumfreien DMEM/Ham's F12, supplementiert mit 10 nM Dexamethason, 16 µM Ethoxyresorufin und 10 µM Dicoumarol.

Nach 5 der insgesamt 120 min Inkubationszeit im Brutschrank wurde der Leerwert entnommen und abgedeckt bei RT gelagert. Währenddessen erfolgte die Erstellung der Resorufin-Standardreihe (0 - 500 nM) im Assay-Medium und die Überführung als Triplett auf eine 96-Well-Platte. Die Proben aus den Wells mit den behandelten Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit als Doppelbestimmung (2 x 90 µl) ebenfalls in die Platte pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl eines Natrium-Acetat-Puffers, angereichert mit 15 Fishman units β -Glucuronidase und 120 Roy units Arylsulfatase, in alle Wells und die Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ über 60 min unter Schwenken. Nach der Applikation von 240 µl Ethanol/Well wurden die Platten 10 min mit 3000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend die optische Dichte (Anregung 540 nm/Emission 595 nm) mit dem Spektrophotometer Tecan Genios Reader bestimmt. Um die Ergebnisse in Relation zu Proteinmenge setzen zu können, wurden die 24-Well-Platten 2 x mit kaltem PBS gewaschen und die Zellen mit 200 µl einer SDS-Lösung (1 % (v/v) SDS in PBS) pro Well lysiert. Im Anschluss wurden die Platten bei -20 °C über Nacht eingefroren. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte am nächsten Tag mittels BCA-Methode (s. 3.2.2.3).

3.2.1.5 Aufnahmestudien mit radioaktiv markierter Folsäure

Um den Einfluss von verschiedenen Substanzen auf die Folsäureaufnahme zu verifizieren, wurden Aufnahmeversuche mit Tritium-markierter Folsäure (³[H]-Folsäure) in den LS180-Zellen durchgeführt. Dabei konnte die intrazelluläre Folatmenge über das Verhältnis von eingesetzter zu gemessener Radioaktivität unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität des markierten Substrates und der Konzentration an nicht markiertem Folat quantifiziert werden.

Es wurden dafür $1,5 \times 10^6$ Zellen in Kulturschalen (Durchmesser 94 mm) ausgesät und über mehrere Tage im Brutschrank kultiviert. Dabei waren die Zellen verschiedenen Cytochrom P450-Induktoren sowie AhR-Antagonisten in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt (s. Tabelle 6). Die Zellernte erfolgte nach einem zweimaligen Waschschrift mit PBS und der Zugabe von je 1 ml einer Trypsin-Lösung (33,3 % (v/v) Trypsin/EDTA (10X) in PBS) für 5 min. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen in 2,5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension von je 5 Zellkulturschalen in einen autoklavierten vorgewärmten 25 ml Erlenmeyerkolben überführt. Diese wurden dann 20 min bei 37 °C und 5 % CO₂ auf einem Plattformschüttler sanft geschwenkt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in 2 ml Eppendorfgefäße überführt, die Zellen bei 4.200 x g für 3 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet jeweils in Krebs-Ringer-Puffer (37 °C, pH-Wert 5.5) resuspendiert. Während dieses Vorganges wurden die Zellen aus mehreren Eppendorfgefäßen eines Erlenmeyerkolbens vereinigt und in vier 2 ml Eppendorfgefäßen gesammelt. Der Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt und das Volumen der Zellsuspension abschließend mit Krebs-Ringer-Puffer jeweils auf 1300 µl eingestellt. Anschließend fand die Überprüfung der Zellvitalität mittels Trypanblau statt (s. 3.2.1.1). Diese lag immer bei mindestens 98 %.

Aus den Eppendorfgefäßen wurden je 1200 µl Zellsuspension in 25 ml Erlenmeyerkolben überführt, die über den ganzen Versuchszeitraum in einem Wasserbad (37 °C) geschwenkt wurden. Die restlichen 100 µl dienten der später folgenden quantitativen Proteinbestimmung und wurden bei -20 °C gelagert (s. 3.2.3.3). Nach einer 5-minütigen Equilibrationsphase erfolgte die Zugabe von 12 µl eines Heiß-Kalt-Gemisches aus Folsäure, ³[H]-Folsäure und Krebs-Ringer-Puffer (s. 3.1.2). Unter ständigem Schwenken wurde zu definierten Zeitpunkten (t = 15 s, 30 s, 45 s, 65 s, 90 s, 120 s, 150 s) ein Aliquot (100 µl) entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen (400 µl) überführt. Um die Reaktion zu stoppen, wurden diese sofort in 4 °C kaltem Eiswasser gekühlt und nachfolgend 20 s mit 10.600 x g bei RT zentrifugiert. Die Röhrchen enthielten 50 µl einer 4M KOH-Lösung und 150 µl einer Silikonölmischung (3:1 Silikonöl 200: Silikonöl 20) und wurden immer vor dem eigentlichen Versuch vorbereitet. Durch die Zentrifugation konnte eine sichtbare Phasentrennung der Zellsuspension erreicht werden. So befand sich dann, durch die Silikonölphase getrennt, die KOH-Phase mit den Zellen im unteren Bereich und der Überstand (Inkubationsmedium) im oberen Bereich des Röhrchens.

Da das Zellpellet über Nacht bei RT in der Kalilauge lysiert wurde, konnten die Zentrifugenröhrchen am nächsten Tag mit einem scharfen Messer in der Silikonölphase durchtrennt werden, wobei der untere Anteil mit dem Zelllysate sowie der Überstand der ersten 3 Proben einer Messreihe in je ein Mini-Vial mit 3 ml Szintillatorflüssigkeit überführt wurde. Mit Hilfe eines Schüttelgerätes wurden die Flüssigkeiten im Mini-Vial durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 12 h bei 37 °C und einer erneuten kräftigen Durchmischung konnte die Radioaktivität der Proben mittels Flüssigkeitsszintillation über 5 min im Szintillationszähler Beckmann LS6500 ermittelt werden.

Die Berechnung der aufgenommenen Substratmenge in pmol/mg Protein erfolgte nach Bestimmung des Proteingehaltes (s. 3.2.3.3) mittels folgender Formel:

$$\frac{\sum dpm}{SA \times 2,22 \times 10^{12}} + \frac{K}{10^4} \times \frac{dpmp \times 10}{\sum dpm \times P} = \text{Aufnahme in M/mg Protein}$$

Σdpm	= dpm Überstand + dpm Zelllysat
SA	= spez. Aktivität in Ci/Mol ($^3[H]$: 40 Ci/mmol)
K	= Kaltsubstanz in Mol/L
dpmp	= dpm Pellet
P	= Proteingehalt in mg/ml

Bestimmung der Aufnahmegeschwindigkeit:

Die Aufnahmerate V_{influx} , (in pmol pro mg protein und min) von $^3[H]$ -Folsäure konnte dann mittels Regressionsanalyse durch folgende Formel bestimmt werden:

$$y = y_0 + a (1 - e^{(-bx)})$$

y	= zellassozierte Folsäure
y_0	= unspezifische Proteinbindung
x	= Zeit in min
a	= Amplitude der Kurve (pmol/mg Protein)
b	= Geschwindigkeitskonstante Kc für den Efflux von intrazellulärer Folsäure in das Medium zurück in 1/min

Aus $a \times b$ ergibt sich die Geschwindigkeit des Folsäure-Influx in Anwesenheit der gewählten Folsäurekonzentration. Für die Berechnung der nichtlinearen Kurvenanpassung wurde die Software SigmaPlot 11.0 verwendet.

Bestimmung des IC_{50} :

Inwieweit die Aufnahme der $^3[H]$ -Folsäure durch potenzielle Inhibitoren beeinflusst wird, konnte unter anderem über die Ermittlung der IC_{50} -Werte gezeigt werden. Dieser Wert gibt die Konzentration eines Hemmstoffes an, die benötigt wird, um die Aufnahme eines Substrates einer bestimmten Konzentration auf 50 % zu senken. Aus der Aufnahmegeschwindigkeit der unbehandelten Kontrolle (100 %) im Vergleich zu den Aufnahmegeschwindigkeiten in Anwesenheit des Inhibitors in verschiedenen Konzentrationen kann der IC_{50} mit der nachfolgenden Formel berechnet werden:

$$Y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)}}$$

Y	= prozentuale Hemmung
x	= Konzentration des Inhibitors
max	= maximale Aufnahmegeschwindigkeit, Anfangswert von Y
min	= minimale Aufnahmegeschwindigkeit, nicht sättigbarer Anteil

Bestimmung der Hemmkonstante K_i :

Um eine Aussage über die Affinität des Hemmstoffes zum Transporter unabhängig von der Substratkonzentration treffen zu können, kann der IC_{50} bei kompetitiver Hemmung in die Hemmkonstante K_i umgewandelt werden.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

S = Substratkonzentration

K_m = Michaelis-Menten-Konstante des Substrates

Für die Ermittlung der Bindungsparameter (K_i , IC_{50}) der Hemmkurve wurde die Software GraphPad Prism verwendet.

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden nach Gentechnikgesetz (GenTG durchgeführt). Das Aktenzeichen des Genehmigungsbescheides für die S1-Anlage lautet AZ: 56-8811.71/122.

3.2.2.1 Isolation von RNA aus LS180-Zellen

Isolation

Für die Isolation von RNA wurde das RNeasy® Mini Kit (Quiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Verfahren beruht auf der spezifischen Bindung von RNA unter hohen Konzentrationen an chaotropen Salzen an die als Anionenaustauscher fungierende Silikat-Gel Membran einer Zentrifugationssäule, auf der die RNA durch mehrere kombinierte Wasch- und Zentrifugationsschritte aufgereinigt und abschließend eluiert werden kann. Die Inaktivierung der intrazellulären RNasen ist durch die im Lysispuffer enthaltenen Verbindungen Guanidium Isothiocyanat (GITC) und β -Mercaptoethanol (β -ME) gewährleistet.

Die LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät, wie zuvor beschrieben kultiviert und trypsiniert. Nach der Auszählung von 5×10^6 Zellen, die für die Herstellung eines Pellets verwendet wurden, folgten 3 Waschschrte mit 5 ml PBS und eine sich jeweils anschließender Zentrifugation für 4 min bei 2.000 x g und 4 °C. Abschließend nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet bei -80 °C gelagert.

In Vorbereitung auf die Isolation wurde das Pellet 10 min bei RT aufgetaut und vorsichtig auflockert. Die Lyse und Homogenisierung der Zellen erfolgte dann durch Zugabe von 600 μ l Lysispuffer (RLT-Puffer). Nach einer Inkubationszeit von 60 s und einer zweimaligen kurzen Durchmischung wurde das Lysat mit 600 μ l 70 % EtOH versetzt, wodurch geeignete Bindungseigenschaften der RNA an die Silica-Membran der Säule erreicht wurden. Der Probenansatz wurde auf eine in einem 2 ml Eppendorfgefäß befindliche Säule aufgetragen und die Säule durch eine Zentrifugation für 15 s bei 14.000 x g und RT mit der Gesamt-RNA

beladen. Um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurden die Proben für 20 min mit einer DNase (70 µl RDD-Puffer + 10 µl DNase) inkubiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrirte mit dem Guanidin-haltigen Puffer RW1 und dem Ethanol-supplementierten Puffer RPE. Dabei erfolgte jeweils eine Zentrifugation für 15 s bei 14.000 x g und RT. Der Durchfluss wurde dabei immer verworfen. Um das Ethanol vollständig zu entfernen, wurde die Säule im Anschluss 1 min bei 14.000 x g und RT zentrifugiert. Die RNA wurde abschließend mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert und sofort auf Eis überführt. Gelagert wurden sowohl die RNA als auch die cDNA (s. u.) bei -80 °C.

Bestimmung des RNA-Gehaltes

Der Konzentration der Gesamt-RNA wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) ermittelt. Dafür wurde das Eluat 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die Extinktion bei OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bestimmt. Die Berechnung des RNA-Gehaltes erfolgte dann anhand nachstehender Formel:

$$\text{Konzentration der RNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{Faktor fuer RNA (40)} \times \text{Verduennung (50)}$$

Dabei entspricht die Absorption von 1 Unit bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Daraus lässt sich der Faktor 40 in der Formel herleiten. Aus der Ratio von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ wurde zudem der Reinheitsgrad der Probe bestimmt. Er sollte mindestens 1,8 betragen, da das Absorptionsmaximum von RNA bei 260 nm liegt, wohingegen das von Proteinen und anderen Kontaminanten bei 280 nm zu finden ist.

3.2.2.2 Durchführung der cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Enzyms RevertAid Reverse Transkriptase, einer genetisch modifizierten Variante der Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MuLV-RT), nach Angaben des Herstellers. Dabei wird durch die Anlagerung der Oligo-dT-Primer mit ihren freien 3'-OH Gruppen an das Poly-A-Ende der einzelsträngigen mRNA eine Matrize gebildet, an der die Polymerase anschließend den resultierenden RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert. Der RNA-Anteil wird im Anschluss mittels der RNase-Aktivität der RevertAid Reverse Transkriptase abgebaut, so dass eine einzelsträngige cDNA entstanden ist. Der genaue Reaktionsansatz für die Synthese von 20 µl cDNA ist Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für 20 µl cDNA

Reaktionsansatz cDNA-Synthese	
5X Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock™ RNase Inhibitor	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µL)	1 µl
Oligo(dT) ₁₈ Primer	1 µl
RNA	1 µg
DEPC-H ₂ O	ad 20 µl

Bei jeder cDNA-Herstellung wurde zudem auch eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der anstatt der Reversen Transkriptase DEPC-Wasser zum Ansatz hinzugegeben wurde. Die Synthese der cDNA erfolgte im Thermocycler für 60 min bei 42 °C mit nachfolgender Terminierung der Reaktion durch eine Erhitzung auf 70 °C für 10 min.

3.2.2.3 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Grundlage für eine RT-PCR ist die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die seit ihrer ersten Anwendung 1983 zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie zählt (SAIKI et al. 1985). Sie ermöglicht eine rasche enzymvermittelte *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Nach der Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge durch eine Erhitzung auf 95 °C erfolgt die Anlagerung der zu den Randbereichen der Zielsequenz komplementären Primern. Durch eine hitzestabile DNA-Polymerase (überlicherweise die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte Taq-Polymerase) kann dann bei 68 - 72 °C (abhängig von der Polymerase) die Primerextension und Amplifikation unter Nutzung von dNTPs stattfinden (Elongation). Dieser Vorgang wird in mehreren Zyklen wiederholt und führt zur exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts. Über eine Modifizierung zur RT-PCR kann diese Methode auch für den Nachweis von RNA verwendet werden. In einem vorgeschalteten Transkriptionsschritt wird dabei die isolierte RNA durch eine Reverse Transkriptase zunächst in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.2.2). Durch diese Methode ergibt sich die Möglichkeit die zelluläre Genexpression zu analysieren.

PCR-Reaktion

Die verwendeten Primer wurden auf der Basis von Sequenzen aus der NCBI-Gendatenbank (s. 3.1.4) mithilfe der Software PrimerSelect (Lasergene 6.0, DNASTAR Inc.) abgeleitet, unter Berücksichtigung verschiedener Kriterien. Die Schmelztemperaturen eines Primerpaars wurden so gewählt, dass sie möglichst nah beieinander und über 55 °C lagen, um eine spezifische Hybridisierung zu ermöglichen. Der GC-Gehalt, das heißt der Anteil der DNA-Basen Guanin und Cytosin an der Gesamtheit der Basen, lag immer über 50 %. Ein hoher GC-Gehalt ist aufgrund von Stapelwechselwirkungen vorteilhaft für die Stabilität der Doppelhelix. Die Länge der Primer betrug immer zwischen 18 und 23 bp. Zudem wurden die Primer hinsichtlich der Möglichkeit zur Bildung von Loops, Hairpins und Dimeren überprüft.

Die lyophilisierten Primer wurden in DEPC-Wasser rekonstituiert und auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Zusätzlich erfolgte die Herstellung einer 1:10 Verdünnung in DEPC-Wasser. Für die PCR-Reaktion fand der DreamTaq Green PCR Master Mix Verwendung. Das angewendete Pipettierschema für die Amplifizierung von 1 µl cDNA ist in Tabelle 8 dargestellt. Um Kontaminationen z. B. mit genomischer DNA auszuschließen, wurde als Negativkontrolle der gleiche Ansatz ohne Zugabe von cDNA beziehungsweise mit äquivalenter Zugabe von RNA aus der Negativkontrolle der cDNA-Synthese (s. 3.2.2.2) verwendet. Die Bedingungen für die RT-PCR wurden wie folgt gewählt:

$95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 2\text{ min}, 35 \times [95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ sec}, n\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ sec}, 72\text{ }^{\circ}\text{C}\ x\text{ sec}], 72\text{ }^{\circ}\text{C}\ 5\text{ min}$

n = Die Annealing-Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde den T_m-Werten der Primer angepasst (s. 3.1.4). Die niedrigste in der Reaktion verwendete T_m wurde dafür um 3 - 5 °C vermindert.

x = Der Elongationszeitraum wurde in Abhängigkeit von der erwarteten Fragmentgröße gewählt, wobei 1 min pro 1000 bp für die Taq-Polymerase zugrunde gelegt wurde.

Die Lagerung der PCR-Endprodukte erfolgte für maximal 4 Wochen bei -20 °C.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die RT-PCR (50 µl)

Reaktionsansatz RT-PCR	
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Master Mix Green	25 µl
RNase freies Wasser	22 µl
cDNA	1 µl

Gel-Elektrophorese

Bei der Auftrennung von DNA macht man sich die Wanderung von geladenen Teilchen in einem elektrischen Feld zunutze. Da die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA im netzartigen Agarosegel von der Molekülgröße abhängig ist, können die in der PCR-Reaktion entstandenen, negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe im Gleichstromfeld elektrophoretisch aufgetrennt werden. Zum Sichtbarmachen der DNA-Banden bedient man sich des DNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid. Der Farbstoff schiebt sich zwischen die DNA-Doppelstränge und intensiviert so die Fluoreszenz unter UV-Licht (366 nm) im Vergleich zum freien Farbstoff. Bei der Herstellung der Gele wurde die Konzentration der Agarose, und damit die Porengröße des Gels, in Abhängigkeit von der amplifizierten Fragmentlänge gewählt (< 500 bp 1,5 % Agarose, 500 - 1000 bp 1,0 % Agarose). Das Lösen der Agarose in 0,5X TBE-Puffer erfolgte durch mehrfaches Aufkochen in der Mikrowelle. Nach der Abkühlung auf ca. 50 °C wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und der Ansatz in eine Gelelektrophoresekammer gegossen. Die Überführung in eine mit 0,5X TBE-Puffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer erfolgte nach Erstarren des Gels (ca. 15 min). In die Taschen des Gels wurden jeweils 3 µl Probe pipettiert und als Größenmarker je nach Fragmentlänge entweder der MassRuler (5 µl, 282,5 ng) oder der 100 bp DNA-Ladder (3 µl, 150 ng) gewählt. Die Auftrennung erfolgte bei großen Gelen (15 x 10 cm) nach einer Ladezeit (5 min, 80 V) über 45 min bei 90 V und bei kleinen Gelen (7,5 x 5 cm) über 50 min bei 80 V. Zur Auswertung der Gele wurden die DNA-Fragmente mittels einer Digitalkamera unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.2.2.4 Nachweis der Mykoplasmenfreiheit mittels RT-PCR

Die Methode der RT-PCR wurde in dieser Studie auch verwendet, um die LS180-Zellen auf eine mögliche Kontamination mit den am häufigsten in der Zellkultur auftretenden Mykoplasmenspezies (u. a. *M. orale*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*) zu untersuchen. Um diese Mykoplasmenspezies zu identifizieren, wurden Primer verwendet, die hochkonservierte Bereiche der jeweiligen 16S-rRNA der Mykoplasmen amplifizieren (UPHOFF und DREXEL 2002).

Zur Durchführung der Untersuchung wurden 3 ml Medium (3 Tage alt) aus einer T75-Zellkulturflasche mit kultivierten LS180-Zellen entnommen (80 % konfluent). Das Medium wurde für 5 min auf 100 °C erhitzt und anschließend mit 2.000 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Reaktionsansatz entsprach dem oben beschriebenen (s. Tabelle 8), statt 1 µl cDNA wurde 1 µg vom Überstand verwendet. Die Bedingungen für die RT-PCR wurden wie folgt gewählt.

95 °C 2 min, 35 × [95 °C 30 sec, 57 °C 30 sec, 72 °C 45 sec], 72 °C 5 min

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wurden 6 µl pro Spur auf ein Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt (s. o.). Die Auswertung erfolgte wiederum mittels Digitalkamera unter Verwendung von UV-Licht.

3.2.2.5 Klonierung von RFC- und PCFT-Teilsequenzen

Die Klonierung der Nukleotidteilsequenzen der beiden Folattransporter RFC und PCFT erfolgte in dieser Studie, um eine Standardreihe für die Quantifizierung der mRNA-Expression von RFC und PCFT durch die quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) zu ermöglichen.

Dafür wurde ein Fragment aus dem kodierenden Bereich des jeweiligen Gens für die verschiedenen Folattransporter (s. Tabelle 5), die das in der quantitativen RT-PCR untersuchte Fragment umfasste, in ein Plasmid (pJET1.2) ligiert und nachfolgend in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert. Nach Vermehrung der Bakterien konnte die Plasmid-DNA mittels Alkalischer Lyse gewonnen werden und wurde nach einer Integritätskontrolle des Inserts durch eine Restriktionsanalyse auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Im Anschluss wurde daraus eine Verdünnungsreihe für den Standard in der qRT-PCR erstellt. Die Versuchsdurchführung wird im Folgenden näher erläutert.

Amplifikation und Konzentrationsbestimmung der RFC- und PCFT-Teilsequenzen

Durch eine RT-PCR-Reaktion (s. 3.2.2.3) wurden zunächst die für die Klonierung benötigten Fragmente der Gensequenz des RFC und des PCFT amplifiziert. Wie bereits oben erwähnt, umfasste diese Sequenz jeweils das untersuchte Fragment der qRT-PCR. Die Auswahl der Primer für diese Reaktion (s. Tabelle 5) erfolgte ebenfalls auf der Grundlage der NCBI-Datenbankeinträge und unter Berücksichtigung der bereits oben genannten Parameter (s. 3.2.2.3). Alle ausgewählten Primer befanden sich in den kodierenden Bereichen der Folattransporter (RFC-Sequenzbereich: 1170 – 1739 bp der NCBI-Gensequenz NM_194255.2, PCFT-Sequenzbereich: 542 - 1236 bp der NCBI-Gensequenz BC010691). Der Reaktionsansatz wurde wie in Tabelle 8 beschrieben unter Verwendung des DreamTaq Green PCR Master Mix sowie 1 µl cDNA, die aus mRNA von unbehandelten LS180-Zellen gewonnen wurde, durchgeführt (s. 3.2.2.2).

Die aus der RT-PCR gewonnenen PCR-Fragmente der RFC- und PCFT-Teilsequenzen (s. 3.2.2.3) wurden anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Konzentration der PCR-Fragmente wurde anhand des Längenstandards (MassRuler), welcher distinkte Mengen an DNA beinhaltet, abgeschätzt. Für eine genaue Quantifizierung der DNA erfolgte das Auftragen der PCR-Reaktionsprodukte auf das Agarosegel jeweils in 3 Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:2, 1:5). Im nächsten Schritt konnte mit Hilfe der bestimmten DNA-Konzentration des PCR-Produktes die benötigte DNA-Menge für die Ligation berechnet werden.

Ligation

Bei dem Prozess der Ligation wird Fremd-DNA in einen Vektor, das Plasmid, eingebaut. Benötigt wird dafür ein durch Restriktionsenzyme linearisiertes Plasmid, um die Fremd-DNA, in diesem Fall die mittels RT-PCR generierten PCR-Fragmente von RFC und PCFT, in den Vektor klonieren zu können. Die Ligation beider Fragmente erfolgte über eine T4 DNA-Ligase.

Als Plasmid fand der pJET1.2/blunt Cloning Vector aus dem CloneJet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) Verwendung, welcher ein Gen für eine Ampicillinresistenz enthält (bla(ApR)). Eine physikalische Karte des Vektors befindet sich im Anhang (Anhang I). Um eine möglichst hohe Effizienz der Ligation zu erreichen, wurden 50 ng dephosphorylierter Vektor und ein 3-facher molarer Überschuss des Inserts (RFC/PCFT-Fragment aus der RT-PCR Reaktion, entsprechend 30 ng RFC und 40 ng PCFT) eingesetzt. Vor Beginn der Ligation wurden mit Hilfe eines Blunting Enzyms die 3'-Überhänge entfernt und die 5'-Überhänge aufgefüllt um glatte Enden der Inserts zu generieren. Dafür wurden jeweils 10 µl des Reaktionspuffers, 1 µl Blunting Enzyme (eine thermostabile DNA-Polymerase zur Erzeugung glatter Enden), 2 µl PCR Produkt RFC (30 ng) bzw. 4 µl PCR Produkt PCFT (40 ng) und Nuclease-freies Wasser ad 18 µl vermischt und für 5 min bei 70 °C inkubiert. Die Ligation erfolgte nach Zugabe von 1 µl (50 ng) Plasmid und 1 µl (5 U/µl) T4 DNA-Ligase über 5 min bei RT.

Transformation

Im Anschluss an die Ligation wurde die Transformation der Plasmid-DNA mit kompetenten *Escherichia coli* NEB 5-alpha F' I^q Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Kryostocks der Bakterien 10 min auf Eis aufgetaut und mit jeweils 2 µl Ligationsansatz versetzt. Im Anschluss wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert und die Transformation durch einen Hitzeschock für genau 30 s bei 42 °C initiiert. Der Ansatz wurde danach nochmals für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 950 µl SOC-Medium versetzt. Vor dem Aufbringen der *E.coli*-Bakterien auf Agarplatten erfolgte das Schwenken des Transformationsansatzes für 1,5 – 2 h bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator. Im Anschluss wurden die Bakterien in verschiedenen Volumina von 5 - 100 µl mit einem abgeflamten Drigalski-Spatel auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten, und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank bebrütet. Nach 12 - 16 h wurden die Platten dem Brutschrank entnommen und die Bakterienkolonien kontrolliert. Zur Aufbewahrung der Petrischalen wurden diese mit Parafilm verschlossen und in einem Kühlschrank bei 4 °C kopfüber gelagert.

Mini-Präparation

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus den generierten Bakterienkolonien über eine Mini-Präparation nach einem modifizierten Protokoll der Alkalischen Lyse nach Maniatis (SAMBROOK et al. 1989). Dafür erfolgte zunächst die Selektion einzelner Klone über die Verwendung eines sterilen Zahnstochers, mit dem jeweils eine Kolonie vom Nährboden entnommen wurde. Dieser wurde in ein Kulturröhrchen mit 3 ml Flüssigkultur (LB-Medium + 50 µg/ml Ampicillin) überführt und die Bakterien über einen Zeitraum von 12 - 16 h in einem Schüttelinkubator (37 °C, 250 rpm) vermehrt. Für die Mini-Präparation wurden 1,5 ml der Übernachtskultur entnommen und in einem 2 ml Eppendorfgefäß bei 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Bakterienpellet in 200 µl eiskaltem Alkalische Lyse Puffer I resuspendiert. Nachfolgend wurde 300 µl Alkalischer Lyse Puffer II in jedes Eppendorfgefäß hinzugegeben und die Lösung 5 - 6 x zügig invertiert. Nach einer Inkubationszeit

von 5 min und der Zugabe von 300 µl eiskaltem Alkalischen Lyse Puffer III wurden die Eppendorfgefäße nochmals für 3 - 5 min auf Eis belassen und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde in ein neues steriles 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zum Aufreinigen der DNA das gleiche Volumen PCI zugesetzt. Nach einer kurzen Durchmischung und einem erneuten Zentrifugationsschritt (10 min, 13.000 rpm, 4 °C) wurde die obere wässrige Phase wiederum vorsichtig in ein neues steriles Gefäß überführt und die Aufreinigung nochmals mit Chloroform wiederholt. Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß das doppelte Volumen Isopropanol zum Ausfällen der dsDNA beigelegt und das Gemisch nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT für 10 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang mit 70 % Ethanol wiederholt. Zum Entfernen der Ethanolreste konnte das entstandene Pellet 2 - 5 min bei RT trocknen und wurde anschließend in 50 µl DEPC Wasser gelöst, mit 0,5 µl RNase versetzt und sogleich auf Eis überführt. Die Lagerung der gelösten DNA erfolgte bei -20 °C. Im Folgenden wurde mittels Restriktionsschnitt die Integrität der Inserts in der Plasmid-DNA überprüft.

Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau bedient man sich der Restriktionsendonukleasen, die bestimmte Basensequenzen von Nukleinsäuren erkennen und dort spezifisch schneiden können. Die DNA-Sequenzen der Inserts und des Plasmidvektors konnten mittels der Software Map Draw (Lasergene 6.0, DNASTAR Inc.) auf das Vorhandensein von Restriktionsschnittstellen überprüft werden. Dabei wurden nur Restriktionsenzyme ausgewählt, die jeweils eine einzelne Schnittstelle entweder im Insert oder im Plasmid aufwiesen. Jeder Restriktionsverdau wurde als Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig angesetzt, um nach der elektrophoretischen Auftrennung im Agarosegel sowohl das Insert im Plasmid nachzuweisen, als auch die Orientierung des eingebauten Inserts zu überprüfen. Eine Übersicht zu den in dieser Studie durchgeführten Restriktionsschnitten enthält Tabelle 10. Der Reaktionsansatz für 20 µl Restriktionsverdau ist Tabelle 9 zu entnehmen. Der gesamte Ansatz wurde jeweils für 1 h bei 37 °C inkubiert und nachfolgend die Reaktion durch eine Erhitzung auf 65 °C über 20 min terminiert. Um die entstandenen Produkte aus dem Restriktionsverdau darzustellen, wurden sie mit 3,5 µl Gel Loading Dye vermischt und davon 7,5 µl in die Tasche eines Agarosegels überführt. Zur Beurteilung der Fragmentlängen wurden wiederum DNA-Marker mitgeführt (100 bp Marker, MassRuler). Die Fragmente wurden nach einer Ladezeit von 5 min bei 80 V über 45 min bei 90 V in einer horizontalen Elektrophoresekammer aufgetrennt und das Gel unter UV-Licht dokumentiert.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für 20 µl Restriktionsdoppelverdau

Reaktionsansatz Restriktionsdoppelverdau		
	RFC-Plasmid	PCFT-Plasmid
HindIII (20.000 U/ml)	0,5 µl	0,5 µl
NheI (10.000 U/ml)	-	1 µl
StuI (10.000 U/ml)	1 µl	-
Puffer 2.1	2 µl	2 µl
DEPC Wasser	15,5 µl	15,5 µl
DNA (1 µg, aus Mini-Präp.)	1 µl	1 µl

Tabelle 10: Restriktionsanalyse der RFC/PCFT-Klone

Eine Teilsequenz der Folattransporter RFC und PCFT wurde in das Plasmid per pJET 1.2 ligiert. Die Insertionsstelle des Inserts befindet sich in der MCS (multiple cloning site) des Plasmids an der Position 371-372. Das Insert des RFC umfasste 570 bp, das Insert des PCFT 779 bp. Ein Restriktionsverdau mit den Enzymen HindIII und StuI des Plasmids mit RFC-Insert erzeugte je nach Orientierung des Inserts im Plasmid ein Fragmentmuster aus 3234 bp und 310 bp (Fragmentmuster 1) oder 2898 bp und 646 bp (Fragmentmuster 2). Ein Restriktionsverdau mit den Enzymen HindIII und NotI des Plasmids mit RFC-Insert erzeugte ein Fragmentmuster mit 2678 bp + 866 bp, da beide Restriktionsenzyme im Plasmid schneiden. Ein Restriktionsverdau mit den Enzymen HindIII und NheI des Plasmids mit PCFT-Insert erzeugte je nach Orientierung des Inserts im Plasmid ein Fragmentmuster aus 2805 bp und 948 bp (Fragmentmuster 1) oder 3518 bp und 235 bp (Fragmentmuster 2). Ein Restriktionsverdau mit den Enzymen HindIII und NotI des Plasmids mit PCFT-Insert erzeugte ein Fragmentmuster mit 2678 bp + 1075 bp, da beide Restriktionsenzyme im Plasmid schneiden.

Restriktionsanalyse			
Plasmid (2974 bp) mit RFC-Insert (570 bp)			
Restriktionsenzyme (Doppelverdau)	Schnittstelle (Position (bp))	Fragmentmuster 1 (bp)	Fragmentmuster 2 (bp)
HindIII (20.000 U/ml)	Plasmid (624)	3234 + 310	2898 + 646
StuI (10.000 U/ml)	Insert (462)		
HindIII (20.000 U/ml)	Plasmid (624)	2678 + 866	2678 + 866
NotI (10.000 U/ml)	Plasmid (328)		
Plasmid (2974 bp) mit PCFT-Insert (779 bp)			
Restriktionsenzyme (Doppelverdau)	Schnittstelle (Position (bp))	Fragmentmuster 1 (bp)	Fragmentmuster 2 (bp)
HindIII (20.000 U/ml)	Plasmid (624)	2805 + 948	3518 + 235
NheI (10.000 U/ml)	Insert (33)		
HindIII (20.000 U/ml)	Plasmid (624)	2678 + 1075	2678 + 1075
NotI (10.000 U/ml)	Plasmid (328)		

Midi-Präparation

Für die Midi-Präparation wurden Plasmid-Klone ausgewählt, bei denen im Restriktionsdoppelverdau ein Insert im Vektor nachgewiesen werden konnte. Die Orientierung des Inserts war für die Verwendung im Hinblick dieser Studie nicht von Bedeutung. Zur Vermehrung der Bakterien wurden 20 µl aus der 3 ml Flüssigkultur des jeweiligen Bakterien-Klons abgenommen, in einen Erlenmeyerkolben (500 ml Volumen) mit 20 ml LB-Flüssigkultur + 50 µg/ml Ampicillin übertragen und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator geschwenkt. Die dicht gewachsene Bakterienkultur wurde dann zur Zentrifugation (4 °C, 6.000 x g, 15 min) in ein Sorvall-Zentrifugenröhrchen überführt und der Überstand vorsichtig und so vollständig wie möglich abgesaugt. Das Pellet konnte durch kräftige Durchmischung in 400 µl Alkalische Lyse Puffer I resuspendiert und auf zwei 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt werden. Die restliche Midi-Präparation folgte dem Protokoll der Mini-Präparation (s. o.). Zur Beurteilung der Qualität und Quantität der Plasmid-DNA wurde anschließend eine photometrische Bestimmung der OD über eine Messung der Extinktion durchgeführt. Sie beruht auf dem gleichen Prinzip wie zur Beurteilung von RNA (s. 3.2.2.1). Allerdings wird in der Berechnung der DNA-Menge ein Faktor von 50 verwendet, da die Absorption von 1 Unit bei 260 nm mit einer Konzentration von 50 µg/ml DNA korrespondiert. Es wurde nur DNA weiter-

verwendet, die einen OD₂₆₀/280 Quotienten > 1,8 und einen OD₂₆₀/230 Quotienten > 2,0 aufwies. Nach der OD-Bestimmung wurde die Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und die Integrität des Inserts mittels Restriktionsschnitt und einer RT-PCR erneut überprüft. Für diesen Restriktionsschnitt wurden die Enzyme HindIII und NotI verwendet, die jeweils eine Schnittstelle im Plasmid aufwiesen (s. Tabelle 10). Der Reaktionsansatz sowie die Durchführung entsprachen der bereits oben beschriebenen Methode. In der RT-PCR mit der Plasmid-DNA fanden die Primer für die folgende qRT-PCR Verwendung (s. Tabelle 4). Über den Nachweis der spezifischen DNA-Fragmente in dieser RT-PCR wurde nochmals die Integrität und Vollständigkeit des Inserts sichergestellt. Abschließend wurde mit der eingestellten Plasmid-DNA beider Zielgene eine Verdünnungsreihe als Standard für die qRT-PCR erstellt. Sie diente zur Quantifizierung der Expression der Transporter RFC und PCFT auf mRNA-Ebene, da dort ein spezifisches Fragment des jeweiligen Carriers in einer bekannten Konzentration vorlag. In der qRT-PCR wurden die Verdünnungsstufen 1×10^{-4} , 1×10^{-5} und 1×10^{-6} µg/µl verwendet.

3.2.2.6 Quantifizierung der RFC- und PCFT-mRNA durch TaqMan qRT-PCR

Die real-time RT-PCR (oder qRT-PCR) bietet die Möglichkeit der Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren in Echtzeit mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen. Im Gegensatz zur konventionellen PCR mit Gelelektrophorese findet die Detektion bereits während der Amplifikationsphase statt. Die hier verwendete TaqMan®-Technologie eignet sich als Verfahren, um das Expressionsverhalten von Genen sehr präzise zu untersuchen. Neben spezifischen Forward und Reverse Primern, die zuvor in der RT-PCR getestet wurden, wird bei dieser Methode zusätzlich eine sequenzspezifische Oligonukleotidsonde eingesetzt, die am 3'-Ende mit einem Quencher (Rhodamin-Derivat, TAMRA) und am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszin-Derivat, FAM oder ROX) ausgestattet ist. Solange die Sonde intakt ist, wird aufgrund der räumlichen Nähe der beiden komplementären Fluorophoren die Fluoreszenzenergie des Rezeptorfarbstoffes auf den Quencher übertragen und eine Fluoreszenzemission nach dem FRET-Prinzip (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) unterdrückt. Nach Anlagerung einer komplementären Zielsequenz wird die Sonde durch die gleichzeitige Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase während der Synthese des Gegenstrangs vom 5'-Ende abgebaut. Die räumliche Trennung von Quencher und Reporter erlaubt nach Anregung eine Fluoreszenzemission mit spezifischer Wellenlänge durch den Reporterfarbstoff. In jedem Reaktionszyklus kommt es zu einer Zunahme der PCR-Produkte und damit der Intensität des lichtinduzierten Fluoreszenzsignals. Da während der exponentiellen Phase der PCR die gemessene Zunahme des Signals direkt proportional zur Menge des Amplifikats ist, kann aus den zuvor gewonnenen Daten die Ausgangsmenge des Templates berechnet werden.

Die qRT-PCR der Proben wurde in Vierfachbestimmung in geschlossenen 96-Well PCR-Platten durchgeführt. Dabei wurde die Menge des jeweiligen Transporters und des Housekeeping-Gens β -Actin in separaten Wells bestimmt. Die Standardreihe wurde als Triplett aufgetragen (s. oben). Zusätzlich wurde als Negativkontrolle für jede Probe eine äquivalente Zugabe von RNA aus der Negativkontrolle der cDNA-Synthese (s. 3.2.2.2) in Doppelbestimmung durchgeführt, um Kontaminationen auszuschließen.

Die verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 4 wiedergegeben und das Pipettierschema für den Reaktionsansatz unter Verwendung von DreamTaq PCR Master Mix ist Tabelle 11 zu entnehmen. Die Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR wurden für beide Transporter (RFC, PCFT) wie folgt gewählt:

95 °C 2 min, 35 × [95 °C 30 sec, 61 °C 30 sec]

Berechnung

Über die Grundlinie wird ein fester Fluoreszenz-Schwellenwert (Threshold) gesetzt, der sich gerade von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Dieser Schwellenwert wird benutzt um den C_t -Wert (cycle threshold) zu berechnen, der definiert wird als Zyklusnummer, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Je niedriger ein C_t -Wert, desto mehr Zielsequenz lag in der entsprechenden Probe vor. Die quantitative Bestimmung der Templates wurde sowohl mittels absoluter als auch relativer Quantifizierung durchgeführt. Für die absolute Quantifizierung der DNA-Menge wurde eine externe Standardreihe verwendet, die über unterschiedliche Verdünnungen mit bekannter Konzentration der entsprechenden Plasmid-DNA erstellt wurde (s. 3.2.2.5). Dann wurden die C_t -Werte gegen die logarithmierten Ausgangskonzentrationen aufgetragen. Mit Hilfe der entstandenen Gerade ließ sich die Ausgangskonzentration an Target-DNA aus dem C_t -Wert einer beliebigen Probe bestimmen. Aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden konnte die Effizienz (E) der PCR-Amplifikation bestimmt werden. Eine Effizienz von 100 % entspricht einer Verdopplung des PCR-Produkts in jedem Amplifikationszyklus. Für die relative Quantifizierung wurde hingegen gleichzeitig die mRNA-Menge des Housekeeping-Gens β -Actin bestimmt. Dieses Referenzgen wird konstant exprimiert und bietet damit die Möglichkeit zur Normierung des Expressionsverhaltens der Zielgene. Die Berechnung erfolgt dann anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Hierbei wird aus den Delta- C_t -Werten beider Gruppen anschließend der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ gebildet.

Tabelle 11: Standardreaktionsansatz für die qRT-PCR (25 µl)

Reaktionsansatz qRT-PCR 25 µl	
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Sonde (10 pmol/µl)	0,5 µl
Master Mix	12,5 µl
RNase freies Wasser	9 µl
cDNA	1 µl

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Western Blot-Analyse

Als Western Blot oder auch Immunoblot wird die Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran bezeichnet, die anschließend über eine Immunreaktion mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Vor dem eigentlichen Western Blot erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel.

Probenvor- und aufbereitung

Um die Proben für den Western Blot zu gewinnen, wurden die LS180-Zellen in T75-Zellkulturflaschen bis zur Ausbildung eines Monolayers im Brutschrank kultiviert. Für die Ernte wurden die Kulturflaschen auf Eis verbracht und 2 x mit kaltem PBS gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe von 350 µl RIPA-Puffer, supplementiert mit 3,5 µl Proteaseinhibitor. Nach kurzem Schwenken wurde das Rohlysat mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 1 h auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte alle 10 - 15 min eine kräftige Durchmischung des Zelllysates. Anschließend wurde das stark visköse Zelllysat 3 - 5 x durch eine Kanüle von 0,55 mm Durchmesser (24 Gauge) gedrückt, die Probe zentrifugiert (1.000 x g, 5 min, 4 °C) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Für die quantitative Proteinbestimmung mittels BCA (s. 3.2.3.3) wurden von dem Lysat 10 µl 1:10 mit RIPA-Puffer verdünnt und als Dreifachbestimmung aufgetragen. Die Standardreihe aus BSA entstand ebenfalls unter Verwendung von RIPA-Puffer.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Über die denaturierende SDS-Page können Proteine durch ein elektrisches Feld in einem diskontinuierlichen Gel nach ihrer Größe aufgetrennt werden (LAEMMLI 1970). Dabei überdeckt die negative Ladung des anionischen Tensids SDS die Eigenladungen der Proteine, indem es an ihnen bindet, was zur gegenseitigen Abstoßung derselben führt. Weil sich die Menge des gebundenen SDS proportional zum Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptids verhält (SHAPIRO et al. 1967), ist es möglich, die SDS-Polypeptid-Komplexe nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Abhängigkeit von ihrer Größe im quervernetzten Polyacrylamidgel aufzutrennen. Durch die Verwendung von Zwei-Phasen-Gelen, mit Konzentrierung und Ausrichtung aller Komplexe in einem oberen Gelabschnitt ("Sammelgel") und der folgenden Auftrennung im unteren Gelabschnitt ("Trenngel"), kann die Auflösung ("Bandenschärfe") der Gele erhöht werden (KING und LAEMMLI 1971).

In der vorliegenden Arbeit wurden 10 %ige Polyacrylamidgele verwendet. Die genaue Zusammensetzung ist in Tabelle 12 wiedergegeben. Nach dem Arretieren der Glasplatten in der Halterung wurde zunächst das Trenngel gegossen und sofort mit Aqua bidest überschichtet, welches nach Abschluss der Polymerisation wieder entfernt wurde. Danach konnte das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet werden. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte vertikale Elektrophoresekammer überführt. Um die Proben auf das Gel aufzutragen, wurden zunächst 40 µl Probe mit 10 µl Probenpuffer (5X) versetzt und für 20 min bei RT inkubiert. Pro Spur wurden dann in der Regel 50 µg oder 100 µg Protein eingesetzt. Zum Nachweis von β -Actin ("Housekeeping-Gen") fanden jedoch nur 10 µg oder 20 µg

Tabelle 12: Zusammensetzung eines 10 %igen Polyacrylamidgels

	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
Acrylamid/Bisacryl (30 %/0,8 %)	3,33 ml	0,67 ml
Trenngelpuffer	2,50 ml	-
Sammelgelpuffer	-	1,25 ml
Aqua bidest	4,12 ml	3,05 ml
APS 10 %	50 µl	30 µl
TEMED	5 µL	5 µl

Verwendung. Als Molekulargewichtsmarker wurden je 3 µl des Proteinmarkers IV (10 rekombinante Proteine, 100 - 200 ng/µl je Protein) genutzt. Im Anschluss folgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben im Gel. Die Proben wurden zunächst bei 80 V für 15 min im Sammelgel konzentriert, bevor sie bei 150 V während einer Laufzeit von 80 min im Trenngel aufgetrennt wurden.

Immunodetektion

Anschließend können die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamid-Gel auf eine Trägermembran (Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membran) transferiert werden. Dabei bleibt das ursprüngliche Trennmuster der Proteine erhalten, so dass sie durch spezifische Antikörper als Bande angefärbt werden können. Die eigentliche Farbreaktion wird durch die Bindung von Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpern an den für das jeweilige Protein spezifischen Primärantikörpern ermöglicht. Die Größe des Proteins kann dann im Folgenden mithilfe von mitgeführten Molekulargewichtsstandards bestimmt werden.

Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte durch ein Semi-dry-verfahren nach Angaben des Herstellers (BioRad). Die Membran wurde zunächst zusammen mit dem Blottingpapier 30 min im Transferpuffer equilibriert. Nachfolgend wurden dann Blottingpapier, Membran, Gel und nochmal ein Blottingpapier übereinander geschichtet und die Kammer verschlossen. Die Übertragung erfolgte über 60 min bei 10 V. Nach Abschluss des Transfers wurden die Membranen 60 min in einer Milchpulverlösung (5 % (w/v) Milchpulver (MP) in TBST) geschwenkt, um die überzähligen Bindungskapazitäten abzusättigen. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper (in 3 % MP in TBST) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Dabei kamen der Anti-SLC19A1 in einer Konzentration von 1:100, der Anti-SLC46A1 in einer Konzentration von 1:1000 und der Anti-ACTB in einer Konzentration von 1:10000 zum Einsatz. Im Falle des SLC19A1 wurde z. T. noch ein spezifisches Blocking Peptid in einer Konzentration von 1:100 hinzugegeben. Dabei handelt es sich um ein ID7-Fusionsprotein des Rfc1 der Ratte (HINKEN et al. 2011). Am nächsten Tag wurden die Nitrozellulose-Membranen zunächst dreimal für je 10 min unter Schwenken in TBST gewaschen und nachfolgend für 60 min mit dem AP-konjugierten Sekundärantikörper (in 3 % MP in TBST) ebenfalls unter Schwenken inkubiert. Als Verdünnung wurde dabei für den Anti-Rabbit-AK 1:4000 und für den Anti-Mouse-AK 1:7000 gewählt. Nach der AK-Inkubation wurden die Membranen viermal je 10 min in TBST und abschließend einmal für 10 min in TBS geschwenkt. Die Nachweisreaktion erfolgte unter Lichtabschluss mit der Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase-Entwicklerlösung sowie das Abstoppen der Reaktion durch Spülen mit dest. H₂O. Zum Auswerten wurden die Membranen getrocknet und anschließend eingescannt.

3.2.3.2 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

Der BCA-Assay nach SMITH et al. (1985) wird eingesetzt, um den Proteingehalt einer Probe photometrisch zu quantifizieren. Dabei kommt es zur sogenannten Biuret-Reaktion, bei der unter alkalischen Bedingungen Cu²⁺-Ionen quantitativ durch das Protein zu Cu⁺-Ionen reduziert werden. Diese bilden dann jeweils mit zwei Molekülen BCA einen wasserlöslichen violetten Chelatkomplex.

Für die Aufarbeitung der Zellen nach den EROD-Experimenten (s. 3.2.1.3) wurde in jedes Well 100 µl einer SDS-Lösung (1 % (v/v) SDS in PBS) pipettiert und die Platten über Nacht bei -20 °C eingefroren. Von diesem Zelllysats wurden nach dem Auftauen jeweils 25 µl für eine Doppelbestimmung in eine 96-Well-

Zellkulturplatte pipettiert. Bedingt durch die hohen Proteinkonzentrationen, die bei den Aufnahmestudien anfielen (s. 3.2.1.4), mussten diese Proben nach dem Auftauen zunächst mit der 1 %igen SDS-Lösung 1:10 verdünnt und davon je 25 µl/Well in einer Dreifachbestimmung in die 96-Well-Platte überführt werden. Dies traf ebenfalls auf die Proteinbestimmung während der Western Blot-Analyse zu (s. 3.2.3.1). In jedem Fall wurden anschließend die BCA-Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 gemischt und von dieser Lösung 200 µl in jedes Well hinzugefügt. Am Spektrophotometer erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm zum Zeitpunkt $t = 0$ min und $t = 30$ min. Über die absolute Zunahme der Absorption konnte anschließend der Proteingehalt der jeweiligen Probe ermittelt werden. Für die benötigte Eichgerade wurde eine Standardreihe über absteigende Verdünnungsstufen von BSA (0 - 1,5 mg/ml BSA in 1 % (v/v) SDS in PBS) erstellt, die als Triplet aufgetragen und gemessen wurde.

3.2.4 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten fanden die Programme Excel 2010 und SigmaPlot 11.0 Verwendung. Die gezeigten Mittelwerte der Viabilitätsversuche und der Aufnahmestudien entstammen mindestens 4 Einzelwertmessungen, wohingegen für die Ergebnisse der EROD-Enzymaktivität die Messwerte von mindestens 2 voneinander unabhängigen Versuchsansätzen verwendet wurden. Als Maß für die Streubreite der Werte um ihren Mittelwert wurde die Standardabweichung (SD) errechnet. Abweichend davon wurde für Transporter-vermittelte Aufnahme von radioaktiven Substanzen sowie in der qRT-PCR der Standardfehler (SEM) angegeben. Der SEM definiert sich als die Standardabweichung der Schätzfunktion und errechnet sich aus der Standardabweichung dividiert durch die Quadratwurzel der Fallzahl (n) der Stichprobe. Stark abweichende Messwerte ("Ausreißer") konnten mithilfe eines G-Tests ermittelt und eliminiert werden. Anhand eines Shapiro-Wilk-Tests wurde die Normalverteilung der Daten überprüft. Die Ermittlung der statistischen Signifikanz erfolgte über eine One-Way Anova (Einweg-Varianzanalyse), je nach Fragestellung entweder im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle oder aller Gruppen untereinander, mit nachfolgendem Holm-Sidak Post-hoc Test. Dabei wurde eine statistische Signifikanz bei $p \leq 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der LS180-Zelllinie

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde die aus einem humanen Kolonadenokarzinom abgeleitete LS180-Zelllinie verwendet, da sie bereits in einigen Aufnahme- und Regulationsstudien als *in vitro* Modell für das humane Intestinum eingesetzt wurde (BRANDON et al. 2006, GUPTA et al. 2008). Die Zellen wachsen in Kultur als Monolayer und zeigen dabei eine epitheliale Morphologie. Zudem exprimieren sie zahlreiche Mikrovilli (TOM et al. 1976). Für die Auswahl der Zelllinie war zum einen die Funktionalität und Induzierbarkeit des Cytochrom P450-Systems, die unter anderem von LI et al. (1998), KARYEKAR et al. (2002) und NETSCH et al. (2006) beschrieben wurde, und zum anderen die Durchführbarkeit von Transportstudien ausschlaggebend (FUKUMORI et al. 2009). Trotz der bisher vorliegenden Daten zur LS180-Zelllinie war es notwendig, verschiedene Parameter wie z. B. die Zytotoxizität der verwendeten Substanzen in der LS180-Zelllinie zu bestimmen.

4.1.1 Toxizitätsstudien

Für die nachfolgenden Regulationsstudien wurde die Zytotoxizität aller verwendeten Substanzen mit Hilfe des WST-1-Zellviabilitätstests bestimmt (s. 3.2.1.2). Dafür wurden die Wirkstoffe in aufsteigenden Konzentrationen zu den Zellen hinzugegeben und über einen Zeitraum von 48 - 72 h inkubiert. Die Auswahl der Vorbehandlungszeit richtete sich nach der geplanten maximalen Inkubationszeit der Substanzen in den folgenden Studien. Über den spektrophotometrisch ermittelten Umsatz des WST-1-Reagenz konnte der Anteil an lebenden, metabolisch aktiven LS180-Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (100 %) bestimmt werden. Anhand der Ergebnisse wurde schließlich für jede Substanz die maximal mögliche Konzentration für die Regulationsstudien festgelegt. Für diese Konzentrationen konnten im Viabilitätstest jeweils keine toxischen Effekte gezeigt werden.

4.1.1.1 Zytotoxizität von TCDD, B[a]P, 3-MC

Um den Einfluss der Substanzen 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD), Benzo[a]pyren (B[a]P) und 3-Methylcholanthren (3-MC) auf die Viabilität der LS180-Zellen zu überprüfen, wurden diese mit einer Dichte von $7,5 \times 10^4$ Zellen/ml auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und mit 0,1 - 100 nM TCDD, 0,1 - 100 nM 3-MC oder 0,01 - 10 µM B[a]P über 72 h inkubiert. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse als Dosis-Wirkungskurven dargestellt. Bei allen drei Substanzen stellte sich in den niedrigen Konzentrationsbereichen ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der Zellviabilität über das Niveau der unbehandelten Kontrolle dar. Der maximale Effekt konnte sowohl bei TCDD als auch bei 3-MC bei einem Einsatz von 1 nM Substanz beobachtet werden (108,3 % \pm 12,8 bzw. 103,5 % \pm 14,0 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle). Im Gegensatz dazu wurde die maximale metabolische Aktivität bei einer Inkubation mit B[a]P erst bei 100 nM erreicht (111,6 % \pm 10,9). Danach kam es bei steigenden Konzentrationen aller drei Substanzen zu einem signifikanten Abfall der Viabilität, die sich auch bei der optischen Kontrolle unter dem Lichtmikroskop als veränderte Zellmorphologie nachvollziehen ließ.

Es wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bestimmt, die im Zusammenhang mit dem WST-1-Test die Konzentration einer Substanz angibt, bei der ein Rückgang der Zellviabilität um 50 % in Relation zu einer unbehandelten Kontrolle beobachtet werden kann. Der IC_{50} -Wert betrug für TCDD 52,45 nM, für B[a]P 3,83 μ M und für 3-MC 62,95 nM. Für die folgenden Experimente wurde eine maximale Konzentration von 10 nM für TCDD und 3-MC sowie für B[a]P 1 μ M ausgewählt.

Zusätzlich wurde in jedem Versuchsansatz das Lösungsmittel in seiner maximal eingesetzten Konzentration untersucht. Bei einer Inkubation mit 0,1 % Toluol (TCDD), 0,1 % DMSO (B[a]P) und 0,1 % Acetonitril (3-MC) konnte jeweils kein Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen verzeichnet werden.

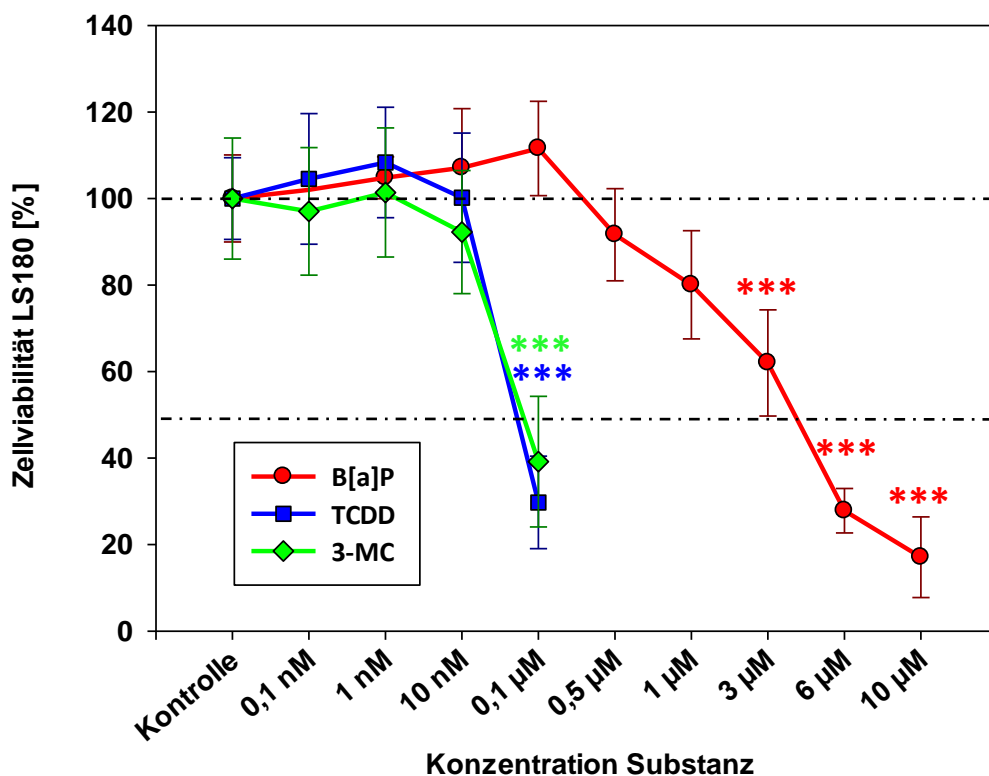


Abbildung 5: Toxizität von B[a]P, TCDD und 3-MC in LS180-Zellen

Die LS180-Zellen wurden mit einer Dichte von $7,5 \times 10^4$ Zellen/ml auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen von TCDD, B[a]P und 3-MC über 72 h inkubiert. Die Zytotoxizität der Substanzen wurde mittels WST-1-Test bestimmt und prozentual zur unbehandelten Kontrolle berechnet (MW \pm SD, n = 12, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, One-Way Anova, Holm-Sidak Post-hoc Test).

4.1.1.2 Zytotoxizität von Raltitrexed und Pemetrexed

Auch der zytotoxische Effekt der Antifolate Raltitrexed (RTX) und Pemetrexed (PMX) auf die LS180-Zelllinie wurde mittels des WST-1-Toxizitätstests bestimmt. Dafür wurden die Zellen mit 0,0001 - 100 μ M RTX oder PMX über 48 h im Brutschrank inkubiert. Wie in Abbildung 6 ersichtlich, ergab sich nach Vorbehandlung mit diesen Substanzen kein initialer Anstieg der Zellviabilität, sondern ein kontinuierliches Absinken mit steigender Substanzdosis. Eine akute Toxizität ließ sich jedoch nicht beobachten. Bei einer Wirkstoffkonzentration von 100 μ M RTX oder PMX konnte eine relative metabolische Aktivität der LS180-Zellen von $74,1 \% \pm 12,6$ bzw. $59,6 \% \pm 7,9$ bestimmt werden. Eine weitere Konzentrationssteigerung war aufgrund der maximalen Lösungsmittelkonzentration von 1 % nicht möglich, so dass für beide Substanzen

in diesem Versuchsansatz kein IC_{50} -Wert zu ermitteln war. Bei der mit untersuchten Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) stellte sich jeweils kein Effekt auf das Zellwachstum dar. Da der Einsatz von RTX und PMX in den folgenden Versuchen nur über einen Inkubationszeitraum von 5 min erfolgte, wurde für beide Wirkstoffe eine maximale Konzentration von 100 μ M festgelegt.

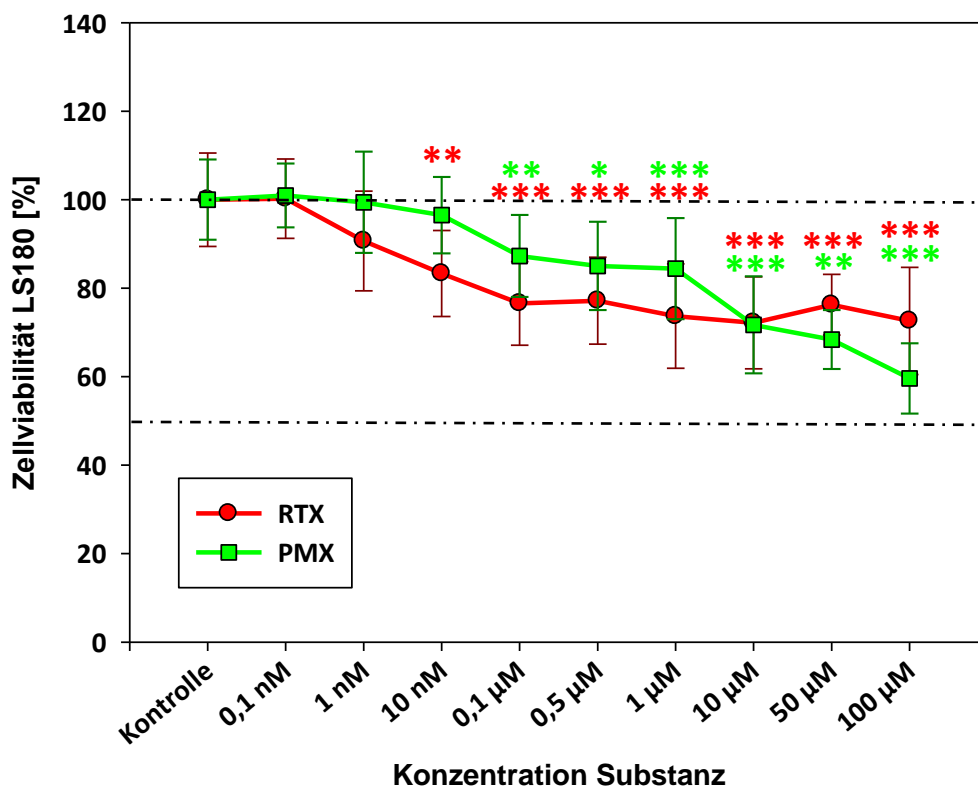


Abbildung 6: Zytotoxischer Einfluss von RTX und PMX auf die LS180-Zelllinie

LS180-Zellen wurden mit einer Dichte von $7,5 \times 10^4$ Zellen/ml auf 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen RTX oder PMX über 48 h inkubiert. Die Ergebnisse repräsentieren $MW \pm SD$, $n = 12$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, One-Way Anova, Holm-Sidak Post-hoc Test).

4.1.1.3 Zytotoxizität von Salicylamid und CH-223191

Um mögliche toxische Effekte der spezifischen AhR-Inhibitoren Salicylamid (SAL) und CH-223191 (CH) zu evaluieren, wurden LS180-Zellen mit 0,1 - 1000 μ M SAL oder 0,1 - 500 μ M CH-223191 über jeweils 72 h vorbehandelt. Wie in Abbildung 7 ersichtlich, führte die Inkubation mit SAL über einen breiten Konzentrationsbereich kaum zu einem Einfluss auf die Zellviabilität. Sie betrug bei 500 μ M $82,9 \% \pm 10,6$ in Relation zur unbehandelten Kontrolle. Der IC_{50} lag jenseits des maximal getesteten Konzentrationsbereiches. Die Dosis-Wirkungskurve der Substanz CH lässt jedoch einen signifikanten Anstieg der Zellviabilität über das Niveau der unbehandelten Kontrolle erkennen. Die maximale metabolische Aktivität der LS180-Zellen ließ sich nach einer Vorbehandlung mit 10 bzw. 50 μ M erreichen ($114,8 \% \pm 8,1$ bzw. $114,9 \% \pm 8,3$). Nach Einwirkung der maximal möglichen Substanzkonzentration (500 μ M) lagen die Messwerte der Zellviabilität bei $60,1 \% \pm 4,7$, so dass auch hier kein IC_{50} -Wert bestimmt werden konnte. Nach einer alleinigen Vorbehandlung mit der Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO) zeigte sich wiederum kein Einfluss auf die metabolische Aktivität der LS180-Zellen ($97,6 \% \pm 9,1$ bzw. $102,8 \% \pm 8,0$). Eingesetzt

wurden in den folgenden Experimenten maximal 500 µM SAL sowie 10 µM CH. Die Ableitung dieser Konzentrationen erfolgte anhand von Literaturquellen (MACDONALD et al. 2004, KIM et al. 2006).

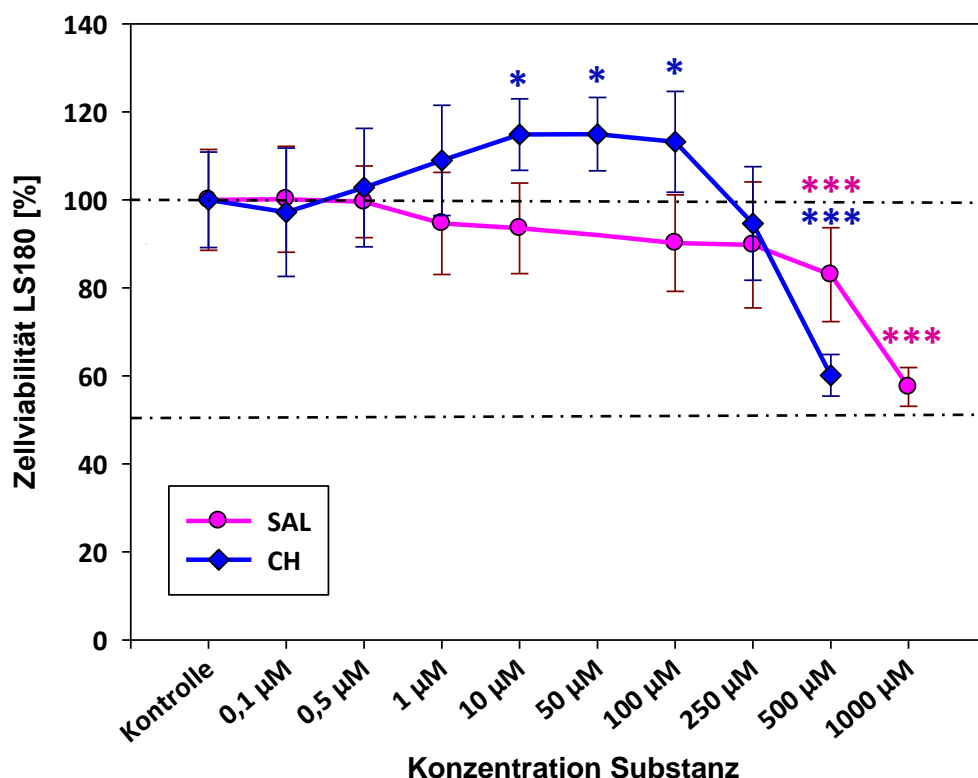


Abbildung 7: Toxizität von SAL und CH in LS180-Zellen

LS180-Zellen wurden mit einer Dichte von $7,5 \times 10^4$ Zellen/ml auf 96-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Nach einer Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen CH oder SAL über 72 h erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1-Test (MW \pm SD, n = 12, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, One-Way Anova, Holm-Sidak Post-hoc Test).

4.1.2 EROD-Enzymaktivität

Für die LS180-Zellen konnte HARPER et al. (1991) bereits ein funktionelles AhR-System unter Verwendung der auch hier eingesetzten Induktoren nachweisen. Allerdings standen keine Daten zur EROD-Aktivität in dieser Zelllinie zur Verfügung, so dass diese zunächst in Anwesenheit von verschiedenen Induktoren überprüft wurde. Für jede Substanz wurde sowohl die Abhängigkeit von der Substanzdosis als auch die Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen ermittelt. Um einen möglichen Einfluss des Proteingehaltes auf die Ergebnisse zu vermeiden, wurde dieser mittels BCA bestimmt (s. 3.2.3.3) und die Ergebnisse in Relation zur Proteinmenge dargestellt.

4.1.2.1 Einfluss von Induktoren

TCDD

TCDD ist der bekannteste Vertreter der polychlorierten Dibenzo-p-dioxine (PCDD) und gilt als stärkster Induktor der AhR-vermittelten CYP1A1-Aktivität wie von POLAND und GLOVER (1973), RIDDICK et al. (1994)

sowie WHITLOCK (1999) beschrieben. So wird es in der Forschung häufig als Positivkontrolle und Vergleichssubstanz bei Studien zur AhR-Induktion eingesetzt (HARPER et al. 1991, LI et al. 1998). Dementsprechend wurde in dieser Studie zunächst die Beeinflussbarkeit der CYP1A1-Aktivität durch TCDD in der LS180-Zelllinie mittels EROD untersucht, da die gemessene Enzymaktivität hauptsächlich CYP1A1-vermittelt ist (s. 3.2.1.4). Dafür wurden die Zellen mit einer Dichte von 7×10^4 Zellen/ml in 96-Well-Platten ausgesät und entweder mit 0,01 - 10 nM über 72 h oder mit 1 nM über 12 - 96 h behandelt.

Die Aktivität der Ethoxyresorufin-O-Deethylase wird anhand der relativen Resorufinbildung in Abhängigkeit von der TCDD-Dosis in Abbildung 8 im Diagramm A wiedergegeben. Bei allen gewählten Konzentrationsbereichen ergab sich in den LS180-Zellen eine signifikante Induktion der EROD-Aktivität. Dabei stellte sich mit steigender Dosis der Substanz TCDD ein deutlicher Anstieg der relativen Resorufinbildung dar. Während diese bei einer Vorbehandlung der Zellen mit 1 nM nur $67,9 \pm 14,9$ pmol/mg Protein/min im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle betrug, konnte mit 10 nM TCDD ein starker

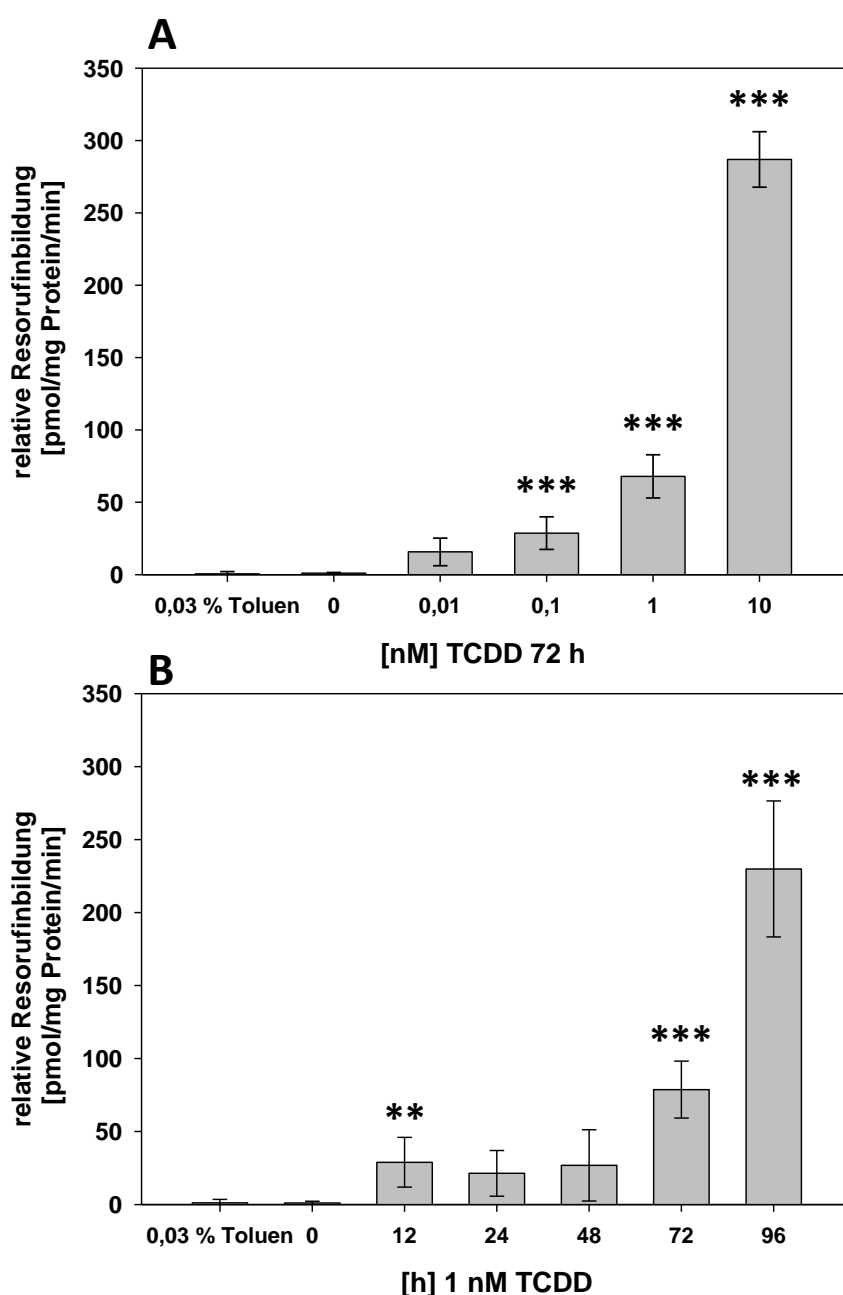


Abbildung 8: Induktion der EROD-Aktivität in LS180-Zellen durch TCDD

Für die Bestimmung der EROD-Aktivität wurden die LS180-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und nach Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen über die beschriebenen Zeiträume ein EROD-Assay durchgeführt. Im oberen Diagramm (A) ist die EROD-Aktivität in Abhängigkeit von der Dosis über 72 h dargestellt, im unteren Diagramm (B) die Abhängigkeit der EROD-Aktivität über die Zeit mit 1 nM TCDD.

Die Ergebnisse repräsentieren MW SD, $n = 16$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, One-Way Anova, Holm-Sidak Post-hoc Test).

Anstieg auf einen rund 4-fach höheren Wert erreicht werden ($285 \pm 19,1$ pmol/mg Protein/min). Eine weitere Steigerung der Dosis war aufgrund der toxischen Effekte von TCDD (s. 3.1.1.1) nicht möglich. Dagegen war in den unbehandelten Kontrollzellen nur eine geringe Grundaktivität zu verzeichnen. Auch in der mit 0,03 % Toluol über 72 h inkubierten Lösungsmittelkontrolle stellte sich die Aktivität des Enzyms als gering dar.

In Diagramm B ist der Verlauf der relativen Resorufinbildung in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationszeiträumen dargestellt. Dafür wurde jeweils 1 nM TCDD eingesetzt, um zu schauen, ob eine Enzymaktivität auch mit 1/10 der maximalen Substanzkonzentration über einen Zeitraum von 96 h nachweisbar ist. Nach einer Behandlungszeit der Zellen von 12 h zeigte sich ein signifikanter initialer Anstieg der Enzymaktivität auf $39,8 \pm 13,3$ pmol/mg Protein/min. Mit steigender Inkubationsdauer ließ sich eine weitere deutliche Zunahme der EROD-Aktivität in den LS180-Zellen nach 72 h ($88,8 \pm 13,7$ pmol/mg Protein/min) und nochmals nach 96 h ($227,2 \pm 46,5$ pmol/mg Protein/min) beobachten. Nach einer Inkubation mit 0,03 % Toluol über 72 h ergab sich wiederum keine messbare Aktivität des Enzyms. In den folgenden Regulationsstudien wurden daher 1 und 10 nM TCDD eingesetzt.

B[a]P

Ebenfalls im EROD-Assay an LS180-Zellen untersucht wurde die karzinogene Substanz B[a]P, die als Prototyp der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) gilt, und dessen Fähigkeit zur CYP1A1-Induktion schon in zahlreichen Studien bestätigt wurde (BUTLER et al. 1989, SHIMADA et al. 1989).

Für diese Untersuchung wurden die Zellen, wie bereits oben beschrieben, in 96-Well-Platten ausgesät und mit 0,01 - 1 μ M B[a]P über 48 bzw. 72 h oder mit 0,1 μ M über 12 - 72 h vorbehandelt. Anschließend wurde die Enzymaktivität der Ethoxyresorufin-O-Deethylase anhand spektrophotometrischer Messwerte berechnet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 9 dargestellt. Diagramm A bildet die EROD-Aktivität mit verschiedenen B[a]P Konzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 72 h ab. Obwohl es auch hier zu einer signifikanten Induktion der Enzymaktivität kam, waren die Werte deutlich niedriger als nach Inkubation mit TCDD über 72 h (s. o.). Dies spiegelt sich auch in der Messung mit 100 nM B[a]P über verschiedene Inkubationszeiten (s. Diagramm B) wieder. Wie auch bei TCDD wurde für die Untersuchung der EROD-Aktivität über die Zeit 1/10 der maximalen Substanzkonzentration gewählt (0,1 μ M B[a]P). Nach einem signifikanten steilen Anstieg auf $218,1 \pm 12,1$ pmol/mg Protein/min nach 12 h fielen die gemessenen Resorufin-Werte sehr schnell wieder ab und erreichten nach 72 h noch $16,6 \pm 1,6$ pmol/mg Protein/min. Aufgrund dessen wurde mit B[a]P zusätzlich die Dosisabhängigkeit der Enzymaktivität mit einer Inkubationsdauer von 48 h (Abbildung 9, Diagramm C) untersucht. Die Messwerte fielen in diesem Versuchsansatz deutlich höher aus und lagen im Bereich der mit TCDD erreichten Ergebnisse. Nach einer Inkubation mit 0,1 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle) konnten keine signifikanten Veränderungen der Enzymaktivität beobachtet werden. Für die weiteren Versuche wurden 0,1 sowie 1 μ M B[a]P eingesetzt.

3-MC

Auch 3-Methylcholanthren (3-MC), das ebenso wie B[a]P zur Gruppe der PAK gehört, wird häufig als Induktor für den Ah-Rezeptor eingesetzt (GONZALEZ et al. 1984, LI et al. 1998). Um seinen Einfluss auf die CYP1A1-Aktivität in LS180-Zellen zu überprüfen, wurden diese sowohl mit 0,01 - 10 nM 3-MC über 24 h

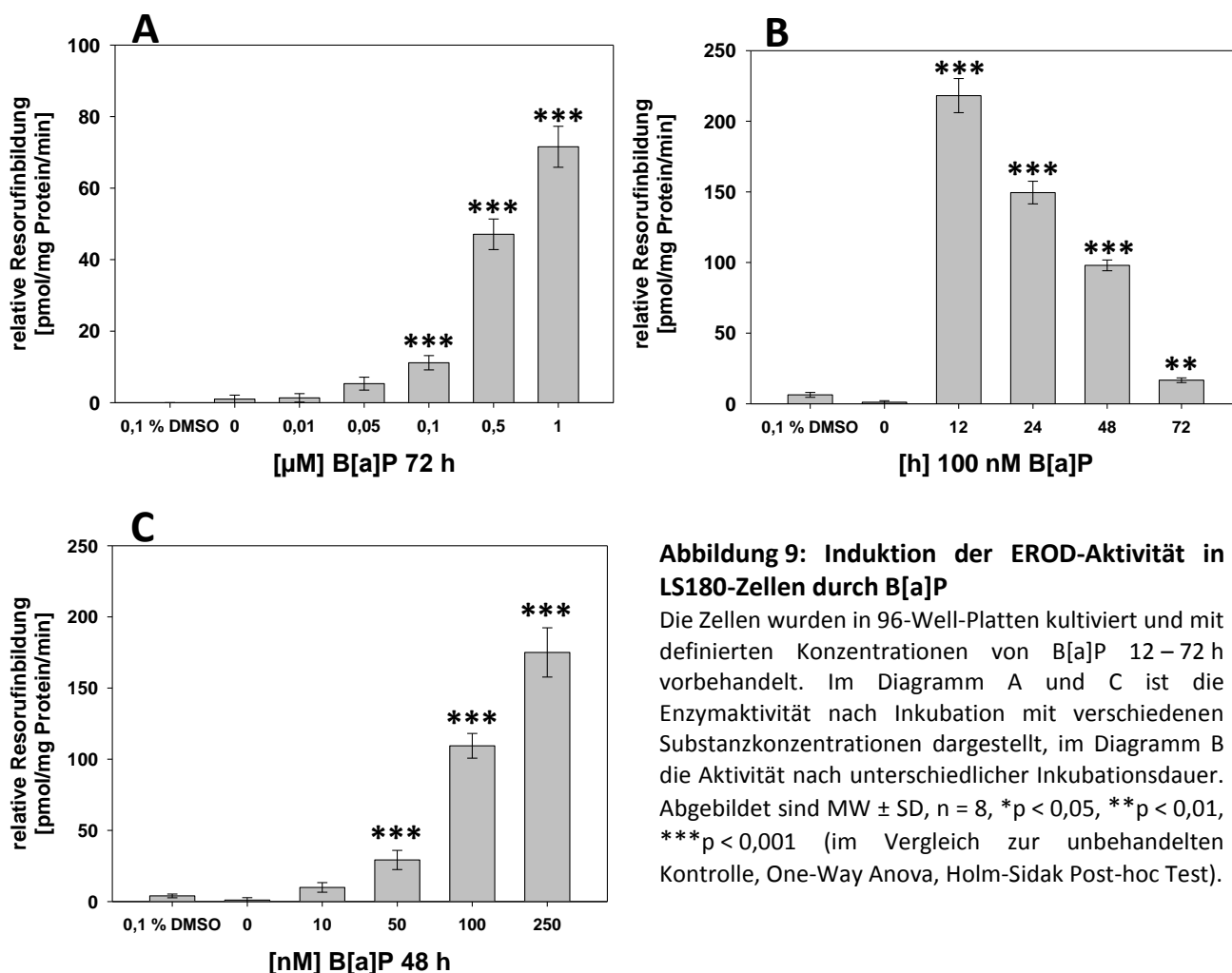


Abbildung 9: Induktion der EROD-Aktivität in LS180-Zellen durch B[a]P

Die Zellen wurden in 96-Well-Platten kultiviert und mit definierten Konzentrationen von B[a]P 12 – 72 h vorbehandelt. Im Diagramm A und C ist die Enzymaktivität nach Inkubation mit verschiedenen Substanzkonzentrationen dargestellt, im Diagramm B die Aktivität nach unterschiedlicher Inkubationsdauer. Abgebildet sind MW \pm SD, n = 8, *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 (im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, One-Way Anova, Holm-Sidak Post-hoc Test).

bzw. 72 h als auch mit 1 nM 3-MC über 72 h inkubiert. Anschließend erfolgte der EROD-Assay. Wie Abbildung 10 zu entnehmen ist, erreichte die EROD-Aktivität nach einer Vorbehandlung mit 3-MC deutlich niedrigere Werte als mit TCDD oder auch B[a]P (s. o.). Mit einer Inkubationsdauer von 72 h (A) konnte nur durch eine Dosis von 10 nM 3-MC ein zu den Kontrollzellen signifikant unterschiedlicher Wert ($17,4 \pm 3,3$ pmol/mg Protein/min) erreicht werden. Im Diagramm zur Zeitabhängigkeit (s. Abbildung 9, B) zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei B[a]P. Folgend einem signifikanten Anstieg nach 12 h ($11,5 \pm 4,2$ pmol) fiel die Enzymaktivität rasch ab und war nach 96 h kaum mehr nachweisbar. Aufgrund dessen wurde die Abhängigkeit der EROD-Aktivität von der Substanzdosis zusätzlich mit einer Inkubationszeit von 24 h untersucht. Die Ergebnisse sind in Diagramm C zu finden (s. Abbildung 10). Es wurden deutlich höhere Resorufinwerte gemessen als nach 72 h, jedoch erreichten sie nur ca. 20 % der Messwerte im Vergleich zu einer Induktion mit B[a]P oder TCDD. Da eine weitere Dosissteigerung aufgrund der Toxizität nicht möglich war, wurde 3-MC für die folgenden Versuche nicht mehr eingesetzt. Wie in den vorangegangenen Versuchen wies die unbehandelte Kontrolle nur eine minimale Grundaktivität auf. Auch in der Lösungsmittelkontrolle (0,03 % Acetonitril) konnte keine signifikante Steigerung der Enzymaktivität ermittelt werden.

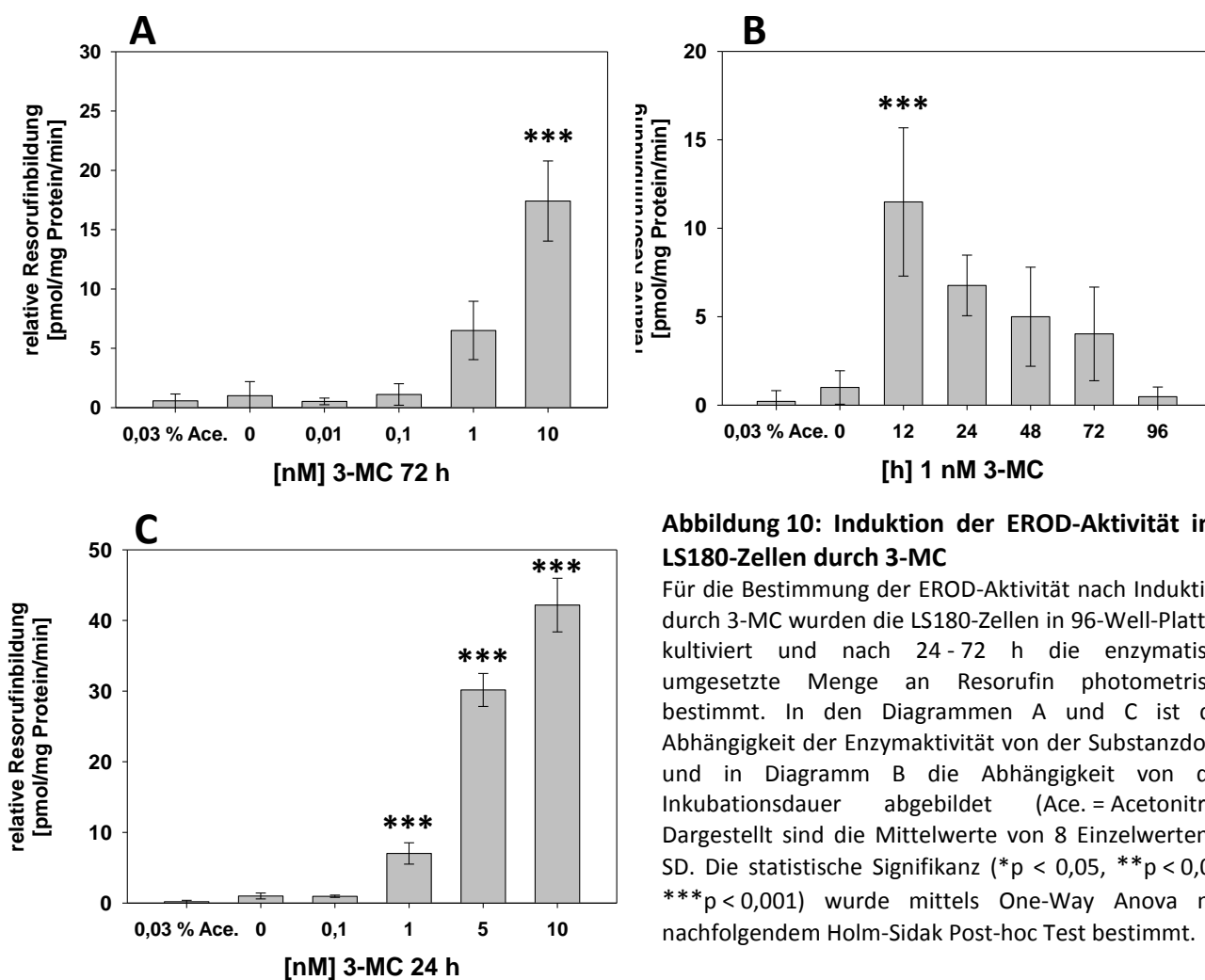


Abbildung 10: Induktion der EROD-Aktivität in LS180-Zellen durch 3-MC

Für die Bestimmung der EROD-Aktivität nach Induktion durch 3-MC wurden die LS180-Zellen in 96-Well-Platten kultiviert und nach 24 - 72 h die enzymatisch umgesetzte Menge an Resorufin photometrisch bestimmt. In den Diagrammen A und C ist die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substanzdosis und in Diagramm B die Abhängigkeit von der Inkubationsdauer abgebildet (Ace. = Acetonitril). Dargestellt sind die Mittelwerte von 8 Einzelwerten \pm SD. Die statistische Signifikanz (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) wurde mittels One-Way Anova mit nachfolgendem Holm-Sidak Post-hoc Test bestimmt.

4.1.3 Nachweis der Transporter-mRNA mittels RT-PCR

4.1.3.1 Nachweis der Importcarrier für Folate

Die LS180-Zellen wurden in diesem Schritt mit Hilfe der RT-PCR auf die Expression der drei Folattransporter FOLR1, PCFT und RFC auf mRNA-Ebene untersucht. Als Kontrolle diente dabei das Housekeeping-Gen β -Actin (ACTB). Die Auswahl der benötigten Primerpaare (s. Tabelle 2 in 3.1.4) erfolgte auf Grundlage von NCBI-Datenbankeinträgen unter Berücksichtigung verschiedener Merkmale wie Schmelztemperatur und GC-Gehalt (s. 3.2.2.3). Wie man in Abbildung 11 erkennen kann, konnte auf dem Agarosegel für jeden Transporter eine einzelne spezifische Bande nachgewiesen werden. Dabei ist im oberen Bild (A) eine Übersicht mit den zugehörigen Negativkontrollen dargestellt, mit denen eine mögliche Kontamination der Proben ausgeschlossen wurde. Verwendet wurde für die Negativkontrolle zum einen 1 μ g RNA statt cDNA (-) und zum anderen als Reagenzienprobe 1 μ l DEPC H₂O statt cDNA (-/-). Im unteren Abschnitt (B) sind die PCR-Banden der einzelnen Folattransporter noch einmal genauer dargestellt. Die PCR-Produkte entsprachen mit Fragmentlängen von 496 bp (RFC), 471 bp (PCFT), 575 bp (FOLR1) und 421 bp (β -Actin)

den erwarteten Produktgrößen. Die RT-PCR wurde zudem mit verschiedenen Passagen der Zellen durchgeführt. Somit werden diese drei Folattransporter in der LS180-Zelllinie auf mRNA-Ebene exprimiert.

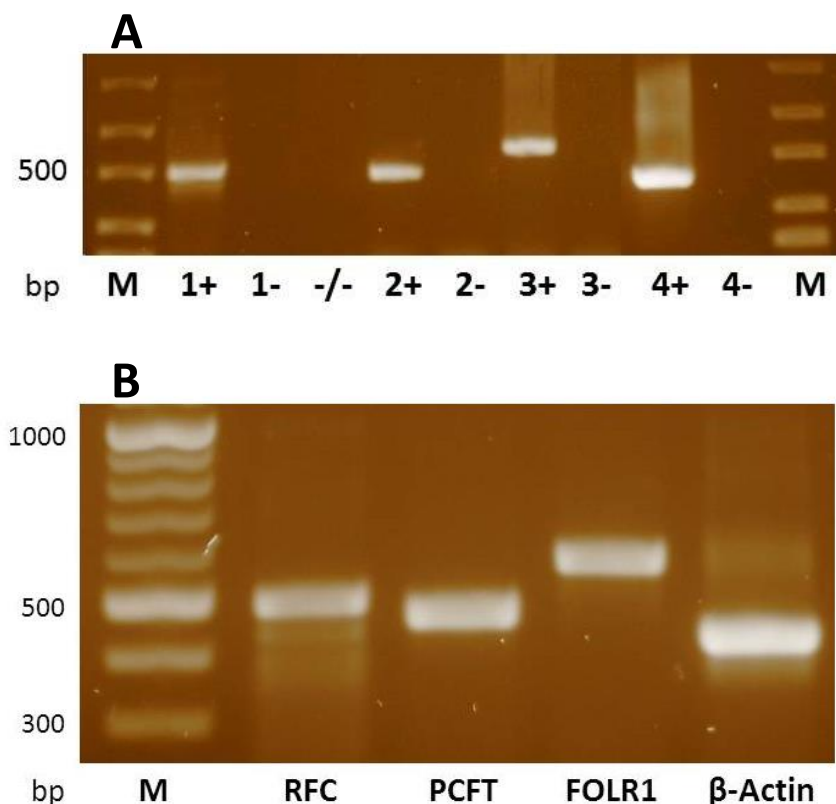


Abbildung 11: Nachweis der mRNA von FOLR1, PCFT und RFC in LS180-Zellen durch RT-PCR

Die DNA-Fragmente der drei Folattransporter wurden mittels RT-PCR unter Verwendung von spezifischen Primern aus 1 µg LS180-RNA nach Umschreiben in cDNA bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C in 35 Zyklen amplifiziert. Es wurden 9 µl (A) bzw. 3 µl (B) des PCR-Produktes auf ein Agarosegel (1%ig) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker (M) wurde der 100 bp-DNA Ladder verwendet. Untersucht wurden RFC ([1], 496 bp), PCFT ([2], 471 bp), FOLR1 ([3], 575 bp) und β-Actin ([4], 421 bp). Im oberen Bild sind zusätzlich die Negativkontrollen dargestellt, gekennzeichnet mit einem Minus hinter der Probennummer. Die Reagenzienprobe wird durch ein -/- symbolisiert.

4.1.3.2 Nachweis der Exportcarrier für Folate

Ebenfalls erfolgte auf mRNA-Ebene der Nachweis der Carrier, die nach heutigem Kenntnisstand in den Export von Folaten aus der Zelle involviert sind (MATHERLY und GOLDMAN 2003, WIELINGA et al. 2005, HOOIJBERG et al. 2006, ASSARAF 2007). Untersucht wurden die Mitglieder 1 - 6 der MRP-Familie, der MDR1 und der BCRP. Die Primerauswahl erfolgte wie oben beschrieben (s. Tabelle 2 in 3.1.4). Zum Teil wurden die Primer bereits von ZIMMERMANN et al. (2005) publiziert. Als Kontrolle fand wiederum β-Actin Verwendung. Dargestellt sind die resultierenden PCR-Banden in Abbildung 12. Dabei befinden sich im oberen Abschnitt (A) neben den Positivkontrollen (+) auch jeweils die zugehörigen Negativkontrollen (-) als Übersichtsbild. Auch in diesem Versuch war in den Negativkontrollen keine Bande sichtbar. Im unteren Abschnitt (B) sind wiederum die PCR-Fragmente der einzelnen Carrier zur besseren Darstellung noch einmal abgebildet. Bis auf den MRP3 konnte für alle Transporter eine einzelne spezifische Bande in der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Hinsichtlich des MRP3 zeigten sich zwei klar voneinander abgrenzbare Banden auf dem Agarosegel, die zwei unterschiedlichen Transkriptvarianten zugeordnet werden konnten

(FROMM et al. 1999, KOOL et al. 1999). Der BCRP scheint in den LS180-Zellen nur mäßig exprimiert zu werden (8+). Bei allen anderen Exportcarriern erlaubt es die RT-PCR jedoch nicht, eine Aussage über die Expressionsmenge zu treffen.

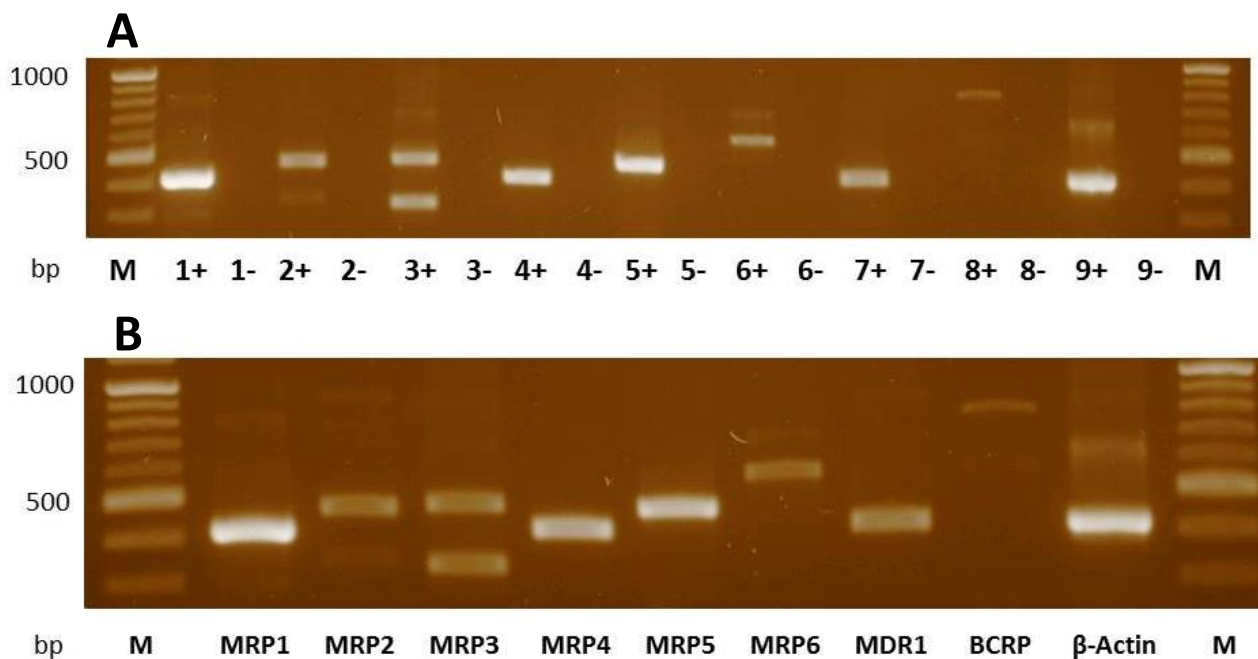


Abbildung 12: Nachweis der mRNA von MRP1 - 6, MDR1 und BCRP in LS180-Zellen durch RT-PCR

Die DNA-Fragmente der 8 Exportcarrier und β -Actin wurden mittels RT-PCR unter Verwendung von spezifischen Primern aus 1 μ g LS180-RNA nach Umschreiben in cDNA in 35 Zyklen amplifiziert. Die Annealing-Temperatur wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer gewählt und die Elongationszeit in Abhängigkeit von der Fragmentgröße variiert. 9 μ l (A) bzw. 5 μ l (B) des PCR-Produktes wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker (M) diente der 100 bp-DNA Ladder. Dargestellt sind die spezifischen Banden für MRP1 ([1], 421 bp), MRP2 ([2], 473 bp), MRP3 ([3], 328 bzw. 477 bp), MRP4 ([4], 416 bp), MRP5 ([5], 479 bp), MRP6 ([6], 563 bp), MDR1 ([7], 421 bp), BCRP ([8], 767 bp), und β -Actin ([9], 421 bp). Im oberen Bild sind zusätzlich die Negativkontrollen dargestellt, gekennzeichnet mit einem Minus hinter der Probennummer.

4.1.4 Nachweis des RFC- und PCFT-Transportproteins mittels Western Blot

Zum Abschluss der Charakterisierung der LS180-Zelllinie erfolgte der Nachweis der Folattransporter PCFT und RFC mittels Western Blot-Analyse auch auf Proteinebene. Bei diesem Verfahren ist es möglich, Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel auf Membranen zu übertragen und durch spezifische Antikörper anzufärben (s. 3.2.3.1). Wie bereits in der RT-PCR (s. o.) wurde als Kontrolle β -Actin verwendet, dass in seiner Rolle als Housekeeping-Gen relativ konstant exprimiert und translatiert wird. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Western Blot-Analyse dargestellt. Der Nachweis wurde für jedes Protein auf einem separaten Blot durchgeführt, erfolgte jedoch im selben Versuchsansatz um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Für β -Actin (links) waren bei einer eingesetzten Proteinmenge von 10 und 20 μ g deutliche Banden bei ~ 47 kDa sichtbar. Auch für den RFC (Mitte) waren mit 50 oder 100 μ g Protein pro Spur Banden nachweisbar, allerdings lagen sie mit ~ 54 kDa etwas niedriger als erwartet, da das Molekulargewicht des RFC ~ 65 kDa beträgt. Auch konnte man auf dem Blot neben der Bande bei 54 kDa weitere kleinere Banden erkennen, die sich schwach anfärbten. Um eine Aussage zur Spezifität der Banden treffen zu können, wurde zusätzlich eine Untersuchung mit einem Rfc1-Blocking Peptide („peptide

competition assay“) durchgeführt (HINKEN et al. 2011). In diesem Fall waren keine Banden auf dem Blot sichtbar (nicht dargestellt). Bei dem Protein des PCFT (rechts) erschienen spezifische Banden bei ca. 50 kDa, jedoch war hier eine relativ hohe Hintergrundfärbung sichtbar. Eine quantitative Aussage wurde bei allen 3 Transportproteinen nicht getroffen.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass alle 3 untersuchten Proteine mit hoher Wahrscheinlichkeit in den LS180-Zellen exprimiert werden.

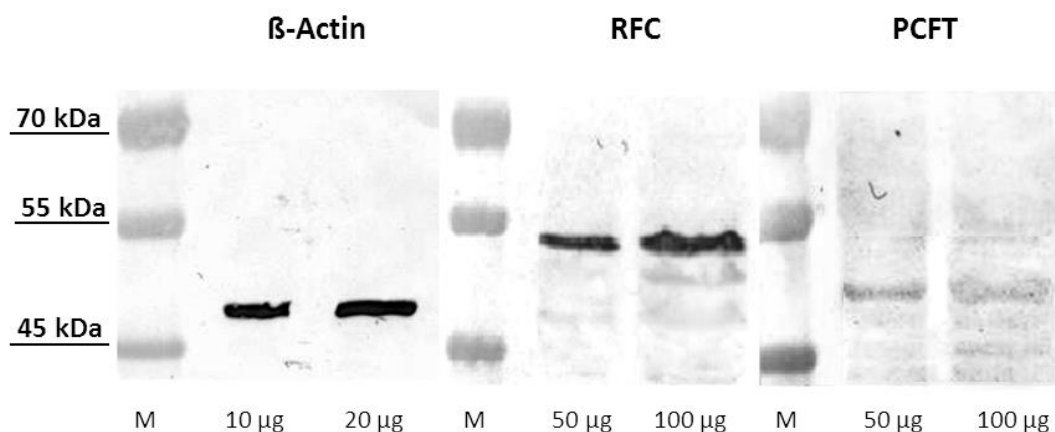


Abbildung 13: Western Blot-Analyse des RFC- und PCFT-Transportproteins in der LS180-Zelllinie

Das über eine SDS-PAGE aufgetrennte Lysat der LS180-Zellen (Auftrag 10 oder 20 µg Protein (β-Actin) bzw. 50 oder 100 µg Protein (RFC, PCFT)) wurde auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und mit den Primär-Antikörpern Mouse Polyclonal Anti ACTB (β-Actin, 1:10000), Rabbit Polyclonal Anti-SLC19A1 (RFC, 1:100) oder Rabbit Polyclonal Anti-SLC46A1 (PCFT, 1:1000) über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden Goat polyclonal Anti-Mouse IgG, AP Conjugate (β-Actin, 1:7000) oder Goat Polyclonal Anti-Rabbit Immunoglobulins/AP (RFC, PCFT; 1:4000) für 1 h eingesetzt. Die Entwicklung des Blots erfolgte durch Western Blue Stabilized Substrate for AP. Als Längenstandard diente der Protein-Marker IV [M].

4.2 Zelluläre Aufnahme von radioaktiv markierter Folsäure

Einen großen Teil der vorliegenden Arbeit nahmen die Untersuchungen zur zellulären Aufnahme von radioaktiv markierten Substanzen in der humanen Kolonzelllinie LS180 ein. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem funktionellen Transport von Folsäure. Für diese Studie wurde eine Betrachtung des Folsäuretransportes im zeitlichen Verlauf benötigt, so dass zunächst in einigen Vorversuchen der Kurvenverlauf der Kurzaufnahme von Folsäure in LS180-Zellen näher betrachtet wurde. In einer vorangegangenen Studie aus der Arbeitsgruppe wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau bereits mit dem Antimetaboliten Methotrexat (MTX) an HPCT-1E3-Zellen durchgeführt, so dass diese Daten als Orientierung für die grundlegenden Parameter genutzt werden konnten (HALWACHS et al. 2007).

4.2.1 Charakterisierung der Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure in LS180-Zellen

Als Transporter für die Aufnahme kamen der seit langem bekannte Reduced Folate Carrier (RFC) sowie der Proton-Coupled Folate Transporter (PCFT) in Frage. Alle beide Carrier konnten in den vorangegangenen Untersuchungen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in den LS180-Zellen nachgewiesen werden (s. 4.1.3. und 4.1.4). Für die Untersuchungen zur Kinetik des Folsäuretransportes wurden die Zellen

trypsiniert, gewaschen und unter Verwendung von Krebs-Ringer-Puffer in eine Suspension gebracht. (s. 3.2.1.4). Während der Messung wurde zu 7 definierten Zeitpunkten ein Aliquot entnommen, die in den Zellen akkumulierte Radioaktivität ermittelt und aus den Messwerten eine nichtlineare Regressionskurve erstellt.

Obwohl im Dickdarm ein pH-Wert herrscht, der zwischen 6.0 und 6.8 liegt, konnte für die direkte Umgebung an den Epithelzellen des Darmes ein azidotischer pH-Wert von ca. 5.5 nachgewiesen werden (SAID et al. 1986). Um vergleichbare *in vivo* Verhältnisse zu generieren, wurde deshalb für die Aufnahmeversuche ein pH-Wert von 5.5 gewählt. Die Aufnahme der Folsäure bei pH-Wert 5.5 wird, unabhängig von der Art der Zellen oder des Gewebes, durchgängig als natriumunabhängig, aber energieabhängig beschrieben (SAID et al. 1997). In den LS180-Zellen wurde bei einer Messung über einen Aufnahmezeitraum von 5 min bereits nach 3 min eine intrazelluläre Plateauphase des Substrates erreicht (nicht dargestellt). Da für die gewählten Fragestellungen vor allem die initiale Folsäureaufnahme im Fokus stand, wurde infolgedessen für die Messung ein Zeitraum von 2,5 min gewählt.

4.2.1.1 Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Zunächst wurde für die Aufnahmeversuche die optimale Substratkonzentration im Heiß-Kalt-Gemisch ermittelt. Der Literatur können für die Folsäureaufnahme in humanen Zellen bei pH 5.5 sehr

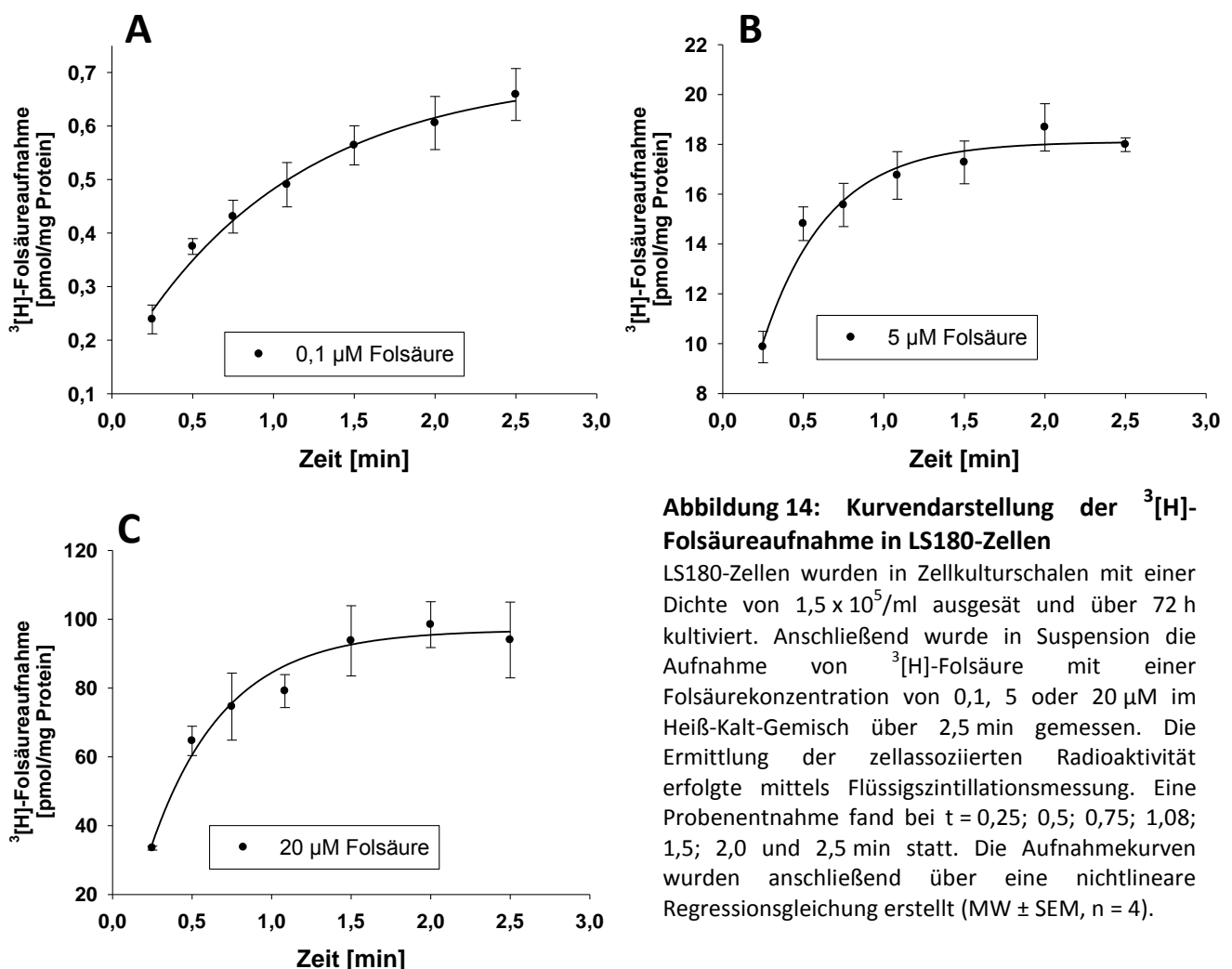


Abbildung 14: Kurvendarstellung der ³[H]-Folsäureaufnahme in LS180-Zellen

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ ausgesät und über 72 h kultiviert. Anschließend wurde in Suspension die Aufnahme von ³[H]-Folsäure mit einer Folsäurekonzentration von 0,1, 5 oder 20 µM im Heiß-Kalt-Gemisch über 2,5 min gemessen. Die Ermittlung der zellassoziierten Radioaktivität erfolgte mittels Flüssigszintillationsmessung. Eine Probenentnahme fand bei $t = 0,25; 0,5; 0,75; 1,08; 1,5; 2,0$ und 2,5 min statt. Die Aufnahmekurven wurden anschließend über eine nichtlineare Regressionsgleichung erstellt (MW \pm SEM, $n = 4$).

unterschiedliche kinetische Parameter entnommen werden, wobei die K_m -Werte zwischen $1,3 \mu\text{M}$ und $134 \mu\text{M}$ lagen (QIU et al. 2006, TAVARES et al. 2010). Aufgrund dieser Tatsache erfolgte in dieser Studie zunächst eine Untersuchung mit verschiedenen Folsäurekonzentrationen von $0,1 - 50 \mu\text{M}$ im Heiß-Kalt-Gemisch. Beispielhaft dafür sind in Abbildung 14 die Aufnahmekurven von $0,1 \mu\text{M}$ (A), $5 \mu\text{M}$ (B) und $20 \mu\text{M}$ (C) abgebildet. Bei allen untersuchten Konzentrationen konnte eine Transportaktivität der LS180-Zellen festgestellt werden, dabei ergaben sich kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Kurvenverläufen. Als Ausgangspunkt ("Nullpunkt") für die Kurve wurde der 15 s-Messwert verwendet. Von diesem ausgehend konnte nach der initialen Aufnahmephase (2,5 min) ein 1,8- ($5 \mu\text{M}$) bis maximal 2,8-facher ($0,1 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$) Anstieg der Radioaktivität verzeichnet werden. Eine Entscheidung hinsichtlich der Folsäurekonzentration für die folgenden Versuche wurde aufgrund der kinetischen Parameter getroffen (s. 4.2.1.2).

4.2.1.2 Kinetische Parameter

Im Folgenden konnten aus den Messwerten der Aufnahmeversuche mit verschiedenen Folsäurekonzentrationen im Heiß-Kalt-Gemisch (s. o.) die kinetischen Parameter K_m und V_{\max} bestimmt werden. Die Michaelis-Konstante (K_m) gibt dabei die Substratkonzentration an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist ($v = \frac{1}{2} \cdot V_{\max}$). V_{\max} ist dagegen die maximale Aufnahmegeschwindigkeit.

In Diagramm A (Abbildung 15) ist der Michaelis-Menten-Plot dargestellt, bei der die Substratkonzentration in mol/L gegen die Aufnahmegeschwindigkeit in $\mu\text{mol}/\text{min}$ aufgetragen ist. In einer doppelt reziproken Darstellung wird daraus der Lineweaver-Burk-Plot (B). Dabei ergibt sich aus dem Schnittpunkt mit der X-Achse $1/K_m$ und aus dem Schnittpunkt mit der Y-Achse $1/V_{\max}$.

Die Berechnung der kinetischen Parameter ergab für die Folsäureaufnahme in den LS180-Zellen einen K_m -Wert von $27,91 \mu\text{M} \pm 6,52$ und für V_{\max} $281,2 \pm 35,16 \text{ pmol}/\text{min}$. Für die folgenden Versuche wurde soweit möglich eine Substratkonzentration von $20 \mu\text{M}$ Folsäure verwendet.

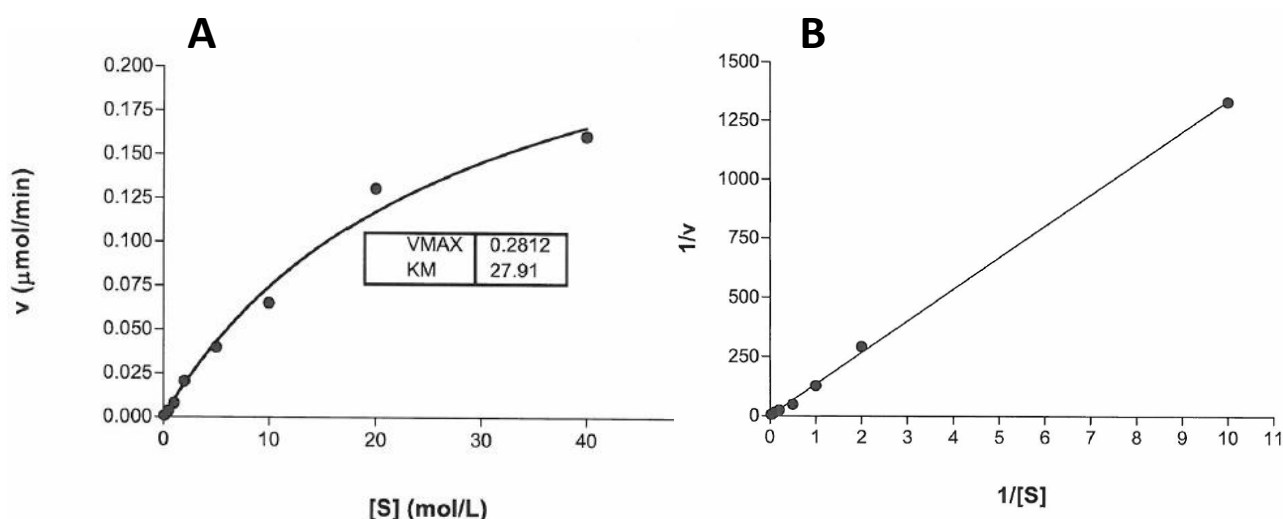


Abbildung 15: Bestimmung von K_m und V_{\max} der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen

Aus den Ergebnissen der Aufnahmeversuche mit unterschiedlichen Folsäurekonzentrationen von $0,1 - 50 \mu\text{M}$ im Heiß-Kalt-Gemisch (s. o.) wurde ein Michaelis-Menten-Plot (A) und ein Lineweaver-Burk-Plot (B) erstellt. Berechnet wurden dabei die kinetischen Parameter K_m und V_{\max} der Folsäureaufnahme in den LS180-Zellen.

4.2.1.3 Einfluss des Konfluenzgrades des Monolayers

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass der Konfluenzgrad, und somit die zunehmende Differenzierung der Zellen, die Aufnahme der Folsäure in humanen Kolonzellen erheblich beeinflussen kann (SUBRAMANIAN et al. 2008). Allerdings erfolgten Untersuchungen bisher nur in Caco-2-Kolonzellen, entsprechende Daten für LS180-Zellen fehlen in der Literatur.

Um den Einfluss des Konfluenzgrades auf die Folsäureaufnahme in LS180-Zellen zu charakterisieren, wurden die Zellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ in Zellkulturschalen ausgesät und bis zu einem Konfluenzgrad von 60 % (2 – 3 d), 80 % (3 – 4 d) oder 100 % (5 d) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Aufnahmeversuche mit 5 μ M Folsäure durchgeführt und die entstandenen Regressionskurven miteinander verglichen (s. Abbildung 16).

Die statistische Auswertung der Messwerte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konfluenzgraden des Monolayers. Die höchste Folsäureaufnahme konnte unter Verwendung einer Zelldichte von 80 % ermittelt werden. Dementsprechend wurden für die weiteren Studien Zellen verwendet, die in der Zellkulturschale einen Konfluenzgrad zwischen 80 und 90 % aufwiesen.

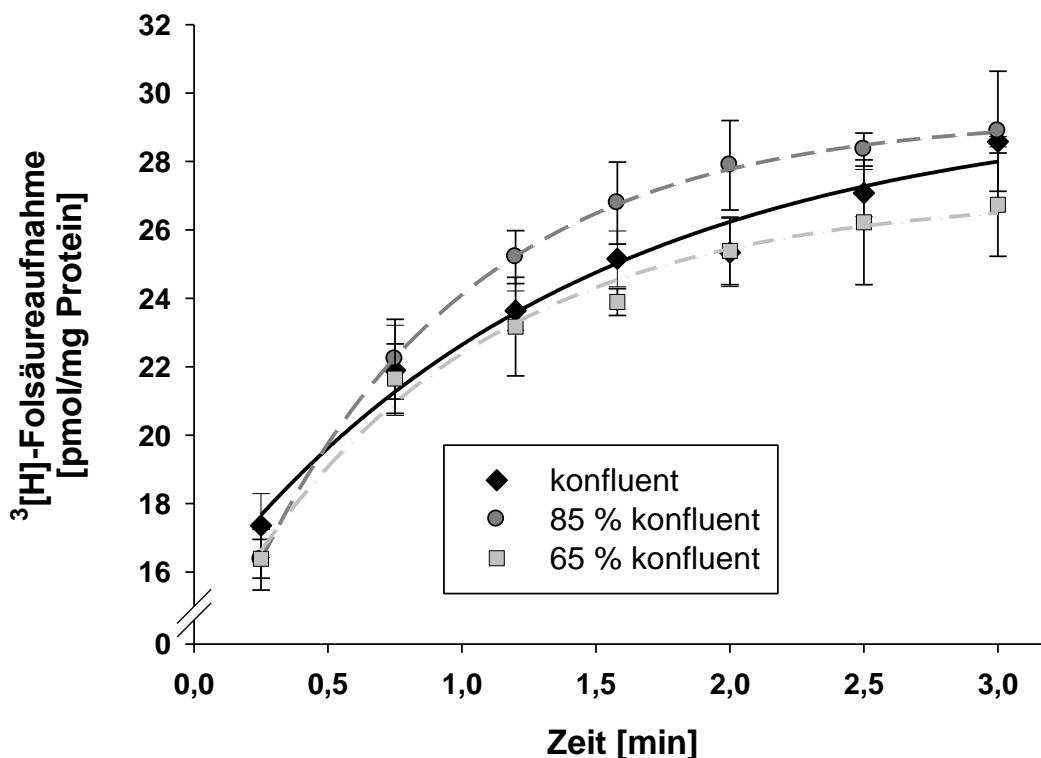


Abbildung 16: Folsäureaufnahme in LS180-Zellen in Abhängigkeit vom Grad der Zellkonfluenz

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 65, 80 oder 100 % im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde mittels Messung der aufgenommenen Menge an ^3H -Folsäure bei $t = 0,25; 0,5; 0,75; 1,08; 1,5; 2,0$ und $2,5$ min die ^3H -Folsäureaufnahme (5 μ M) bestimmt und eine Kurvenanpassung durch nichtlineare Regression erstellt (s. 3.2.1.4). Der Abbildung zu entnehmen ist jeweils der Mittelwert \pm SEM in pmol/mg Protein ($n = 6$). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kurven ermittelt werden (One-Way Anova, Holm-Sidak Post-hoc Test).

4.2.1.4 Aufnahme bei 4 °C

Abschließend wurde der Einfluss der Temperatur auf den Folsäuretransport in den LS180-Zellen untersucht. Da bei 4 °C ein aktiver Transport in die Zellen nur eingeschränkt stattfinden kann (TSUJI et al. 1994) und die Folataufnahme in Darmzellen in der Literatur als temperaturabhängig beschrieben wurde (SAID et al. 1997), erlaubte dies den möglichen Einfluss von Diffusion und unspezifischer Bindung auf die gemessenen Werte zu ermitteln. Die LS180-Zellen wurden für den Transportversuch, wie in 3.2.1.4 beschrieben, in Suspension verbracht und der Versuch mit 20 µM Folsäure im Heiß-Kalt-Gemisch sowohl bei 37 °C als auch bei 4 °C durchgeführt. Wie in Abbildung 17 ersichtlich, konnte bei einer Temperatur von 4 °C in den LS180-Zellen keine aktive Transportaktivität mehr verzeichnet werden. Innerhalb der ersten 30 s fiel ein geringgradiger Anstieg der zellassozierten Radioaktivität auf, bevor die Messwerte wieder abfielen und zum Ende der Messreihe sogar unter dem Ausgangsniveau lagen (15 s: 37,9 ± 3,9 pmol/mg Protein; 180 s: 36,8 ± 1,9 pmol/mg Protein). Somit konnte gezeigt werden, dass der Transport von Folsäure in die Zelle zu einem großen Teil auf einem aktiven Transportmechanismus beruht. Die gemessene zellassozierte Radioaktivität bei 4 °C spricht für eine unspezifische Bindung der ^3H -Folsäure an die Zellmembran beziehungsweise in Bezug auf den Kurvenauschlag bei 30 s möglicherweise für die Beteiligung einer passiven Diffusion.

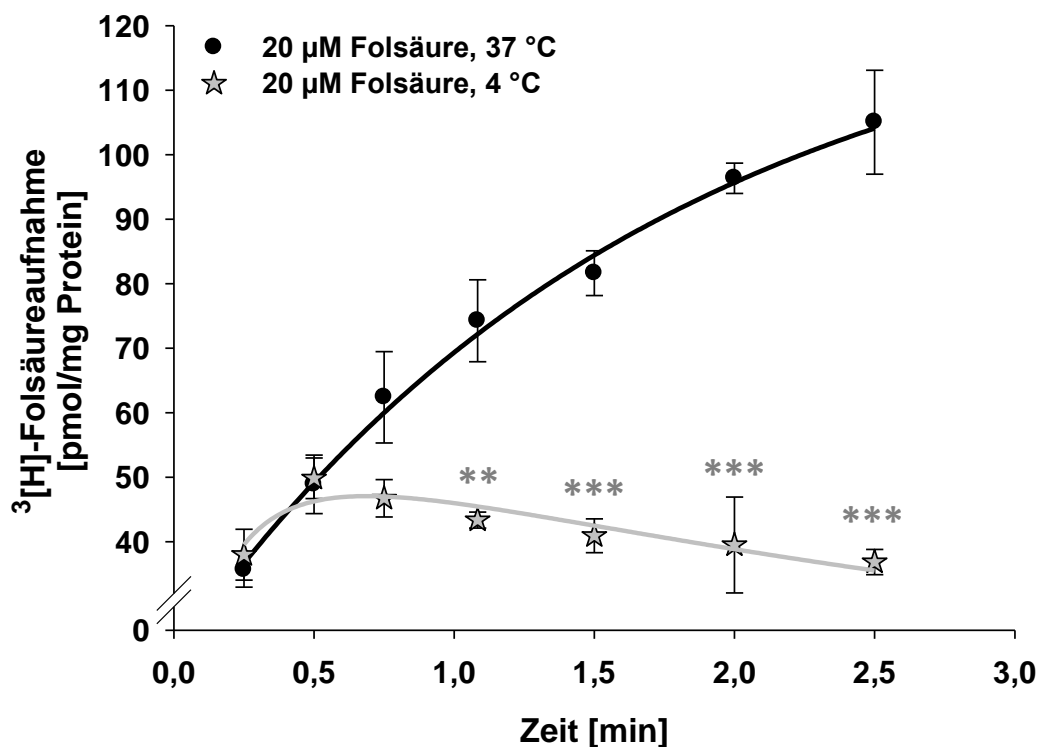


Abbildung 17: Temperaturabhängigkeit der Folataufnahme in LS180-Zellen

Für diesen Transportversuch wurden LS180-Zellen in Zellkulturschalen ($1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) ausgesät und über 72 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Suspension verbracht und nach Zugabe von 20 µM Folsäure im Heiß-Kalt-Gemisch die aufgenommene Radioaktivität mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt und als Mittelwert ± SEM (n = 4) dargestellt. Die Probenentnahme fand bei t = 0,25; 0,5; 0,75; 1,08; 1,5; 2,0 und 2,5 min statt. Dabei wurde die Aufnahme entweder bei 37 °C oder bei 4 °C durchgeführt. Eine signifikante Abweichung der Messwerte bei 4 °C in Bezug zur Kontrolle (37 °C) wurde mittels One-Way Anova mit Holm-Sidak Post-hoc Test ermittelt (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

4.2.2 Einfluss von Inhibitoren auf die zellvermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure

Nach heutigem Kenntnisstand sind höchstwahrscheinlich mehrere Transporter an der intestinalen Folataufnahme beteiligt, insbesondere der RFC und der PCFT. Um ihren möglichen Anteil an der Folsäureaufnahme zu quantifizieren, wurde in dieser Studie mit den zwei spezifischen Inhibitoren Raltitrexed (RTX) und Pemetrexed (PMX) gearbeitet. Beide gehören zur Substanzgruppe der Folsäure-Antagonisten (Antifolate) und werden zur Chemotherapie verschiedener Tumorarten in der Humanmedizin eingesetzt. Sie besitzen unterschiedliche Affinitäten zu den beiden Transportsystemen RFC und PCFT, die zur Differenzierung genutzt werden können.

RTX (ZD 1694) ist ein Quinazolin-Derivat, dass spezifisch die Thymidylat-Synthase (TS) hemmt und vor allem zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms eingesetzt wird (TAKIMOTO 1996). Die Aufnahme in Säugerzellen erfolgt hauptsächlich über den RFC (WESTERHOF et al. 1995, CHATTOPADHYAY et al. 2006). Der K_i -Wert für den PCFT wird in einer Studie von WANG et al. (2004) bei der Aufnahme von $0,5 \mu\text{mol/L}$ $^3\text{[H]}$ -MTX bei pH 5.5 in RFC-deletierten HeLa-Zellen mit 531 nmol/L angegeben.

PMX ist ein relativ neuer Wirkstoff aus der Gruppe der Antimetabolite. Im Gegensatz zum RTX greift er an mehreren Stellen in die folsäureabhängige Nukleotidsynthese ein, da es die Enzyme TS, Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) und Glycinamid-Ribonukleotid-Formyltransferase (GARFT) hemmt. Es wird als Zytostatikum unter anderem beim Bronchialkarzinom oder beim Pleuramesotheliom des Menschen eingesetzt. PMX wurde als spezifisches Substrat für den PCFT identifiziert (WANG et al. 2002, CHATTOPADHYAY et al. 2006). Sein K_i -Wert für den PCFT liegt folglich mit $91,0 \text{ nmol/L}$ deutlich niedriger als der K_i -Wert von RTX (WANG et al. 2004).

Die Aufnahmestudien wurden wie unter 3.2.1.5 beschrieben durchgeführt. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte einzeln oder in Kombination in definierten Konzentrationen 5 min vor Beginn der Messung. Aufgrund von akuten zytotoxischen Effekten von RTX und PMX bzw. Überschreitung der maximalen Lösungsmittelkonzentration (1 %) in höheren Substanzkonzentrationen ($> 100 \mu\text{M}$) wurden die folgenden Versuche mit einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ Folsäure im Heiß-Kalt-Gemisch durchgeführt. Nur so war es möglich, einen 500-fachen Überschuss an Hemmstoff im Aufnahmeversuch zu gewährleisten. Zur besseren Darstellung sind im folgenden Balkendiagramm (s. Abbildung 18) 2 Messpunkte aus den Regressionskurven wiedergegeben, zum einen der gemessene Wert nach 1,25 min, der sich im linearen Bereich der Regressionskurve befindet (grüne Balken) und zum anderen der Wert nach 2,5 min aus dem Sättigungsbereich der Aufnahme (blaue Balken). Die ersten zwei Balken stellen die Folsäureaufnahme ($0,1 \mu\text{M}$) in Kontrollzellen dar. Die folgenden repräsentieren im Vergleich die Zugabe eines 5-fachen Überschuss des Hemmstoffs PMX ($0,5 \mu\text{M}$) zum Heiß-Kaltgemisch an Folsäure ($0,1 \mu\text{M}$). Hier war eine Reduktion der Folsäureaufnahme um 12,6 % (1,25 min) bzw. 21,01 % (2,5 min) zu bemerken. Diese Reduktion war jedoch nicht statistisch signifikant, was möglicherweise auf die hohe Variabilität in den Daten zurückzuführen ist. Deutlicher fiel die Abnahme der intrazellulären Radioaktivität und damit der aufgenommenen Menge an Folsäure nach Zugabe von $0,5 \mu\text{M}$ RTX aus (35,61 bzw. 43,47 %), so dass hier ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen ermittelt wurde. Eine maximale Reduktion der Folsäureaufnahme ergab sich jedoch nur durch eine Kombination beider Antifolate (je $0,5 \mu\text{M}$). In diesem Fall war kaum noch eine Zunahme der intrazellulären Radioaktivität, und somit der Transportaktivität, zu verzeichnen. Die Reduktion in Bezug zur Kontrolle betrug nach 1,25 min 43,35 % und nach 2,5 min 55,12 %.

Diese Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine Beteiligung beider Transporter (RFC, PCFT) an der Folsäureaufnahme in den LS180-Zellen.

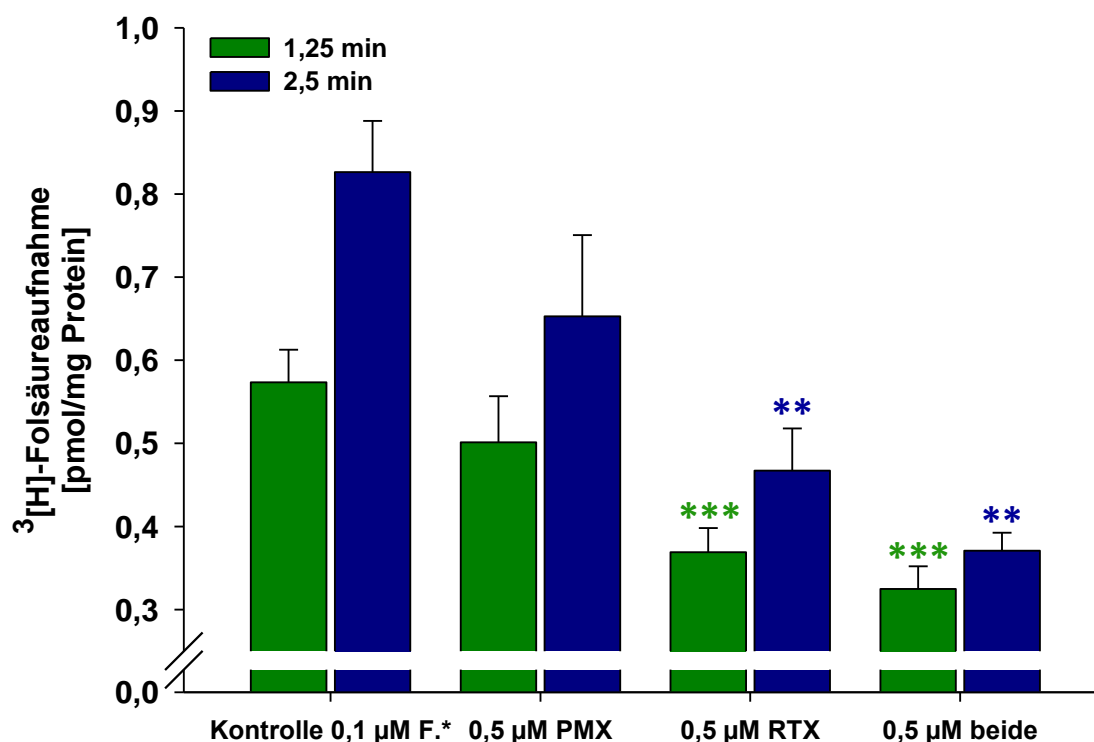


Abbildung 18: Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch Antifolate

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und für 72 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden Aufnahmeversuche mit Tritium-markierter Folsäure (F.*) in Suspension durchgeführt. Die Folsäurekonzentration betrug $0,1 \mu\text{M}$ im Heiß-Kalt-Gemisch. $0,5 \mu\text{M}$ RTX oder PMX wurden entweder alleine oder in Kombination 5 min vor Beginn der Messung hinzugegeben. Aus den Messwerten zu den Zeitpunkten $t = 1,25$ und $t = 2,5$ min wurde der intrazelluläre Folsäuregehalt bestimmt (MW \pm SEM, $n = 8$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Zugabe von Hemmstoff, One-Way Anova, Holm-Sidak Post-hoc Test).

Im weiteren Verlauf der Studie wurden Transportversuche mit $0,1 \mu\text{M}$ Folsäure im Heiß-Kalt-Gemisch nach der Zugabe von verschiedenen Konzentrationen der beiden Hemmstoffe über einen großen Dosisbereich ($0,01 - 50 \mu\text{M}$) durchgeführt. Beispielhaft dafür wird in den folgenden Grafiken die Folsäureaufnahme nach 5 min Inkubation mit 1, 5 oder $10 \mu\text{M}$ des jeweiligen Inhibitors im Vergleich zu den Kontrollzellen dargestellt. Abbildung 19 gibt die konzentrationsabhängige Reduktion der Folsäureaufnahme nach Zugabe von RTX wieder. Bereits mit $1 \mu\text{M}$ RTX zeigte sich ein starker signifikanter Rückgang der Folsäureaufnahme. Wie zu erwarten war, lagen die Regressionskurven nach Zugabe von $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ RTX noch etwas niedriger als mit $1 \mu\text{M}$ RTX. Es stellte sich auch hier kaum eine Transportaktivität dar. Für alle drei RTX-Konzentrationen konnten signifikante Unterschiede zur Kontrolle ermittelt werden (ab Wert 4, s. Tabelle A1, Anhang II). Untereinander waren die RTX-Konzentrationen nicht statistisch signifikant verschieden. Etwas anders stellten sich die Verläufe der Regressionskurven nach Zugabe von PMX dar (s. Abbildung 20). Es kam auch hier bei einer Hemmstoffkonzentration von $1 \mu\text{M}$ zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Folsäureaufnahme (signifikant Wert 5 - 7, s. Tabelle A1, Anhang II). Allerdings fiel diese Hemmung etwas schwächer aus als bei RTX. Die Regressionskurven der Folsäureaufnahme nach Zugabe von 5 und $10 \mu\text{M}$ PMX entsprachen in etwa den Werten von RTX.

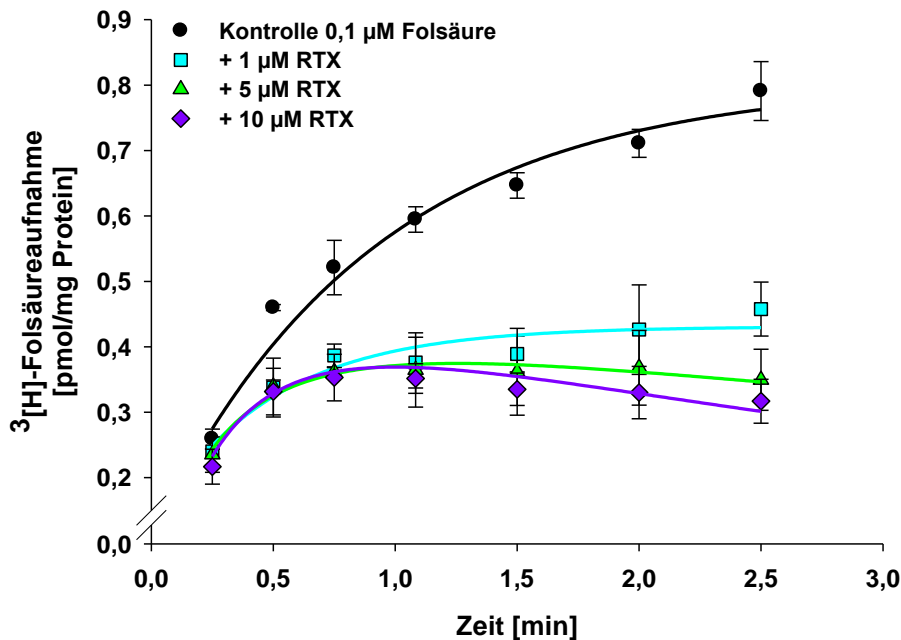


Abbildung 19: Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch RTX

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen (1×10^5 Zellen/ml) für 72 h im Brutschrank kultiviert. Im Anschluss wurden funktionelle Aufnahmeversuche mit Tritium-markierter Folsäure ($0,1 \mu\text{M}$) durchgeführt. Verschiedene Konzentrationen RTX wurden 5 min vor Beginn der Messung zur Suspension zugegeben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM ($n = 4$), die Daten zur statistischen Auswertung befinden sich in Tabelle A1 (Anhang II).

Im Gegensatz zu den Aufnahmeversuchen mit RTX ergaben sich bei einer Zugabe von PMX zur Zellsuspension statistisch signifikante Unterschiede der Folsäureaufnahme zwischen den Konzentrationen $1 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$ bzw. $10 \mu\text{M}$ (s. Tabelle A1, Anhang II). Die Regressionskurven unter Zusatz von 5 und $10 \mu\text{M}$ PMX waren untereinander hingegen nicht statistisch signifikant verschieden.

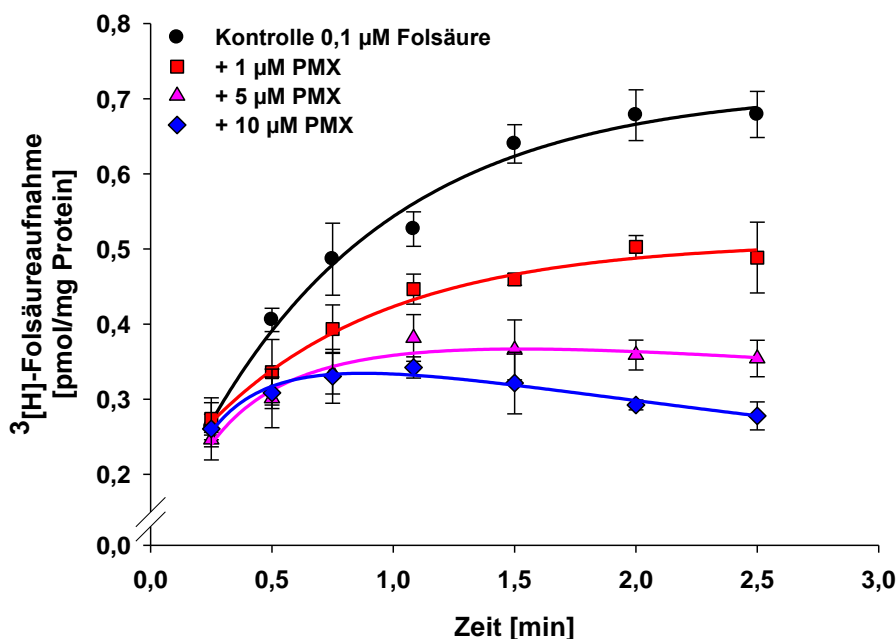


Abbildung 20: Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch PMX

Bei diesen Aufnahmeversuchen mit $0,1 \mu\text{M}$ ^3H -Folsäure wurden die LS180-Zellen 5 min vor Beginn der Messung mit verschiedenen PMX-Konzentrationen inkubiert und aus den Daten der Aufnahme nichtlineare Regressionskurven erstellt (MW \pm SEM, $n = 4$). Die statistischen Daten sind separat in Tabelle A1 (Anhang II) wiedergegeben.

Um einen Einfluss der Folsäurekonzentration im Heiß-Kalt-Gemisch auf die Ergebnisse dieser Aufnahmeversuche auszuschließen, wurden die Experimente zusätzlich mit 20 μM Folsäure im Heiß-Kalt-Gemisch unter Zugabe jeweils der 5-fachen Konzentration (100 μM) an Hemmstoff (RTX, PMX) durchgeführt. Eine höhere Inhibitor-dosis konnte aufgrund der Überschreitung der maximalen Lösungsmittelkonzentration nicht eingesetzt werden. Wiederum wurde die intrazelluläre Radioaktivität zu den Zeitpunkten $t = 1,25$ min und $t = 2,5$ min in den LS180-Zellen bestimmt und die Ergebnisse verglichen.

Wie man in Abbildung 21 erkennen kann, stellte sich dieses Balkendiagramm sehr ähnlich zur Abbildung 18 dar. Die Inhibition der Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle lag sowohl bei Zugabe von PMX (19,35 %; 15,4 %) als auch von RTX (42,13 %; 47,05 %) auf einem vergleichbaren Niveau zu den vorangegangenen Versuchen. Im Gegensatz zum Versuch mit 0,1 μM Folsäure und 0,5 μM Hemmstoffkonzentration ergab sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollzellen und der Zugabe von PMX bei $t = 1,25$ min. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Konzentration der Folsäure im Heiß-Kalt-Gemisch nur einen geringen Einfluss auf die Ergebnisse hat, wenn der Inhibitor in demselben molaren Verhältnis hinzugegeben wird.

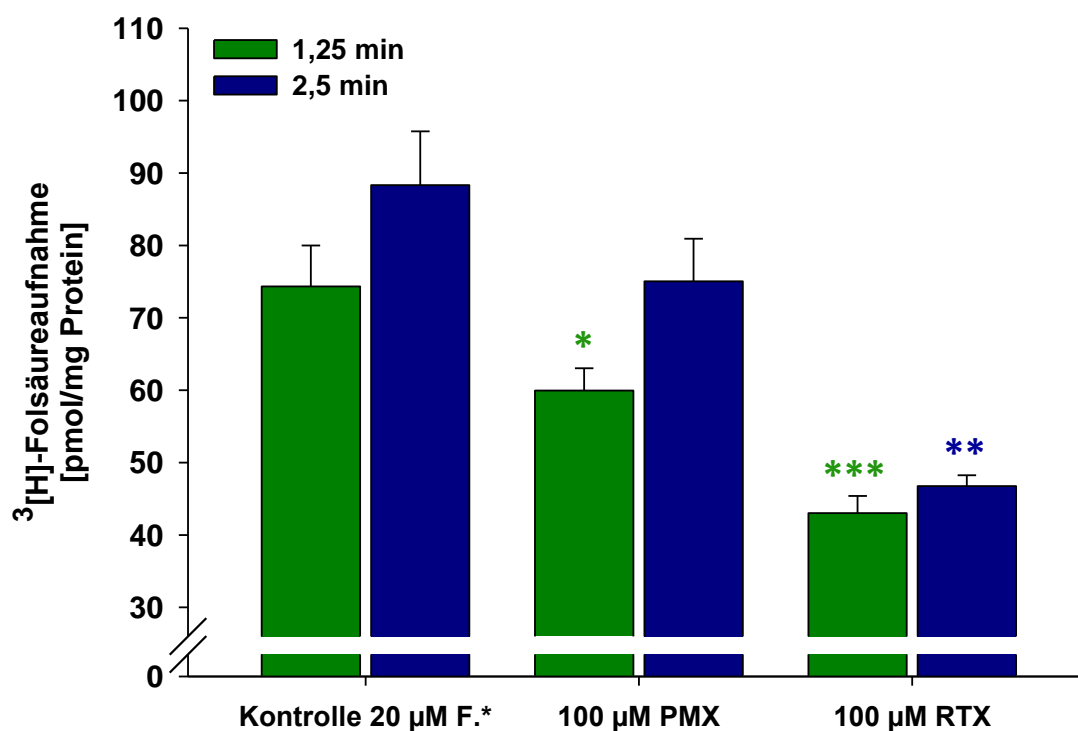


Abbildung 21: Beeinflussung der Folsäureaufnahme (20 μM) in LS180-Zellen durch Antifolate

Es wurden Aufnahmeversuche mit Tritium-markierter Folsäure (F.*, 20 μM) in LS180-Zellen durchgeführt. Es wurden 100 μM RTX oder PMX 5 min vor Beginn der Messung zur Zellsuspension zugegeben und die intrazelluläre Radioaktivität mittels Flüssigszintillation bei $t = 1,25$ und $t = 2,5$ min bestimmt. Als Balkendiagramm abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM ($n = 4$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Zugabe von Hemmstoff, One-Way Anova, Holm-Sidak Post-hoc Test).

4.2.2.1 Bestimmung des IC_{50} und des K_i -Wertes

Abschließend wurden aus den Ergebnissen der Transportstudien mit $0,1 \mu\text{M}$ Folsäure in Kombination mit den verschiedenen Konzentrationen beider Inhibitoren die V_{influx} -Werte bestimmt und in Relation zur Kontrolle (100 %) gesetzt. Mittels nichtlinearer Regression (One-site competition, s. 3.2.1.5) wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und jeweils der IC_{50} bestimmt. Er beträgt für RTX $0,4044 \mu\text{M}$ und für PMX $0,7138 \mu\text{M}$. Die beiden Hemmkurven sind Abbildung 22 zu entnehmen.

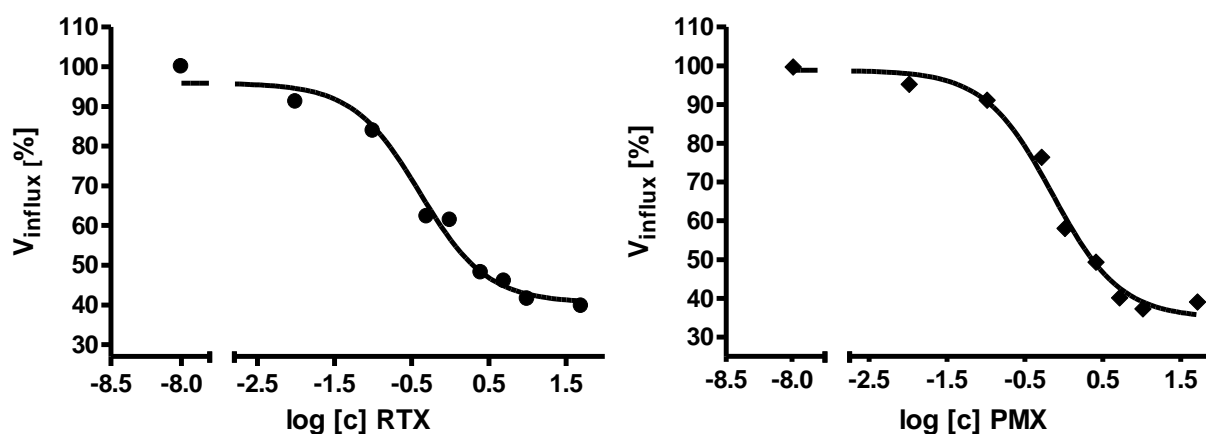


Abbildung 22: Hemmkurven der ^3H -Folsäureaufnahme durch Antifolate

Die Aufnahmestudien mit $0,1 \mu\text{M}$ ^3H -Folsäure wurden über einen Zeitraum von 2,5 min in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen PMX oder RTX über einen Dosisbereich von $0,01 \mu\text{M}$ – $50 \mu\text{M}$ in LS180-Zellen durchgeführt ($n = 4$). Die Aufnahmegeschwindigkeit wurde mittels nichtlinearer Regressionsanalyse bestimmt und in Relation zur Aufnahme in Kontrollzellen ohne Zugabe von Hemmstoff (100 %) gesetzt. Dargestellt ist der Verlauf der Hemmkurve bei Auftragung in halblogarithmischer Darstellung der Konzentration. Die Hemmkurve wurde über eine nichtlineare Regressionsgleichung (One-site competition) erstellt.

Weiterhin ist es bei einer kompetitiven Hemmung möglich, eine Aussage über die Affinität des Hemmstoffes zum Transporter unabhängig von der Substratkonzentration zu treffen, indem der IC_{50} -Wert unter Verwendung der Michaelis-Menten-Konstante der Substanz in die Hemmkonstante K_i umgewandelt wird (s. 3.2.1.5). Die Berechnung ergab für RTX einen K_i von $0,4029 \mu\text{Mol/L}$ und für PMX einen K_i von $0,7112 \mu\text{Mol/L}$.

4.2.3 Einfluss von TCDD und B[a]P auf die zellvermittelte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure

In dieser Studie wurden die LS180-Zellen bereits hinsichtlich der Transporterausstattung sowie der funktionalen Parameter untersucht (s. 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3). Im Anschluss erfolgte die Charakterisierung des initialen Folsäuretransportes mittels Tritium-markierter $^3\text{[H]}$ -Folsäure. Dabei konnten die kinetischen Parameter K_m und V_{\max} bestimmt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die LS180-Zellen als *in vitro* Modell eignen, um Aussagen zum intestinalen Folsäuretransport *in vivo* treffen zu können. Nun folgen Untersuchungen zur Regulation der Folsäureaufnahme durch Xenobiotika wie TCDD und B[a]P, die als ubiquitär auftretende, persistente Umweltkontaminanten auch in Lebensmitteln vorkommen können.

Um den Einfluss der beiden AhR-Agonisten TCDD und B[a]P auf den Transport der Folsäure zu evaluieren, wurden die Zellen mit den jeweiligen Substanzen über einen Zeitraum von 24 - 120 h vorbehandelt. Die eingesetzten Konzentrationen orientierten sich an den Ergebnissen der Vorversuche (EROD- und Toxizitätsstudien (s. 4.1.2, 4.1.1)). Anschließend wurden die Aufnahmeversuche, wie in 3.2.1.5 beschrieben, durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen für 72 h mit der maximalen Substanzdosis (10 nM TCDD bzw. 1 μM B[a]P) inkubiert, da nach diesem Zeitraum messbare Effekte im EROD-Assay sowohl mit B[a]P als auch

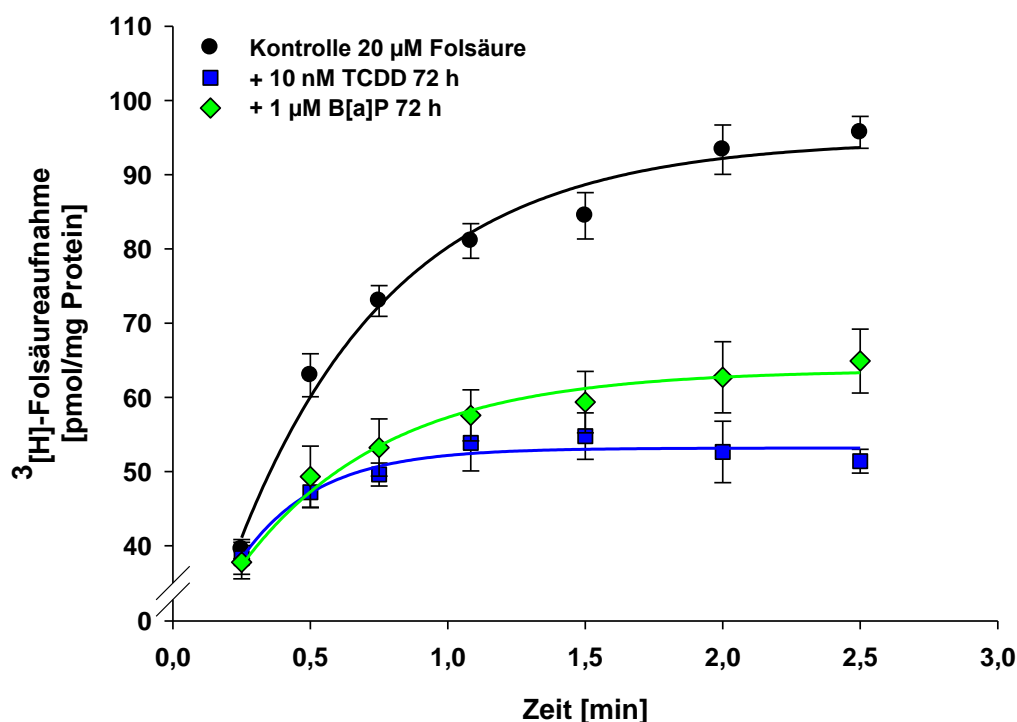


Abbildung 23: Funktionelle Transportaktivität in LS180-Zellen nach 72 h Inkubation mit AhR-Agonisten

Für die Untersuchung der Folsäureaufnahme wurden LS180-Zellen in Zellkulturschalen ausgesät ($1,5 \times 10^5$ Zellen/ml). Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 10 nM TCDD oder 1 μM B[a]P für 72 h. Anschließend wurde die aufgenommene Menge an $^3\text{[H]}$ -Folsäure im Flüssigszintillator bei $t = 0,25; 0,5; 0,75; 1,08; 1,5; 2,0$ und 2,5 min nach Zugabe von $^3\text{[H]}$ -Folsäure (20 μM) bestimmt und aus den Messwerten eine Kurvenanpassung mittels nichtlinearer Regression durchgeführt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM in pmol/mg Protein ($n = 12$). Die statistischen Daten sind separat in Tabelle 13 wiedergegeben.

mit TCDD beobachtet werden konnten (s. 4.1.2.1). Nach Durchführung der Transportversuche wurden aus den Daten unter Verwendung einer nichtlinearen Regressionsgleichung Kurvenverläufe erstellt, die in Abbildung 23 abgebildet sind. Die statistischen Daten sind zur besseren Übersicht separat in Tabelle 13 wiedergegeben.

Die obere schwarze Kurve repräsentiert die Folataufnahme in unbehandelten LS180-Zellen, die als Kontrolle dienten. Der V_{influx} betrug $94,72 \pm 2,1$ pmol/mg Protein/min. Im Vergleich dazu konnte nach Inkubation mit 10 nM TCDD (blaue Kurve) eine signifikante Reduktion der funktionellen Transportaktivität im Vergleich zur Kontrolle dargestellt werden, der Influx betrug $36,12 \pm 4,4$ pmol/mg Protein/min. Dies entspricht einer Verminderung der zellulären Folataufnahme um 61,87 %. Ähnliches zeigte sich nach einer Vorbehandlung mit 1 μ M B[a]P (grüne Kurve), bei der sich eine statistisch signifikante Reduktion der initialen Aufnahmegeschwindigkeit über 2,5 min um 52,39 % in Relation zur unbehandelten Kontrolle ergab. Damit war die Reduktion etwas schwächer ausgeprägt im Vergleich zu den Zellen, die mit TCDD vorbehandelt worden waren. Bei beiden Induktoren ergab sich nach einem initialen Anstieg der intrazellulären Folsäureakkumulation über ca. 1 min keine weitere Folsäureakkumulation, während es bei der Kontrolle auch nach diesem Zeitpunkt noch zu einem deutlich Anstieg der intrazellulären Folsäurekonzentration kam, die erst bei ca. 2,5 min ihr Plateau auf wesentlich höherem Niveau erreichte.

Tabelle 13: Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme nach Inkubation der LS180-Zellen mit 10 nM TCDD oder 1 μ M B[a]P über 72 h

Dargestellt sind die Signifikanzen, die mittels einer One-Way Anova und Holm-Sidak Post-hoc Test zwischen den einzelnen Messpunkten der Kurven zu den verschiedenen Zeitpunkten bei $t = 0,25; 0,5; 0,75; 1,08; 1,5; 2,0$ und 2,5 min (Wert 1 - 7) ermittelt wurden. Sternchen repräsentieren statistische Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p > 0,05$ nicht signifikant (n. s.), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

	10 nM TCDD 72 h	1 μ M B[a]P 72 h
Wert 1 (0,25 min)	n. s.	n. s.
Wert 2 (0,5 min)	**	**
Wert 3 (0,75 min)	***	***
Wert 4 (1,08 min)	***	***
Wert 5 (1,5 min)	***	***
Wert 6 (2,0 min)	***	***
Wert 7 (2,5 min)	***	***

4.2.3.1 Modulation in Abhängigkeit von der Substanzdosis

Anschließend erfolgten Untersuchungen zur Modulation der Aufnahmegeschwindigkeit von Folsäure durch verschiedene Konzentrationen der CYP P450-Induktoren, um die Dosisabhängigkeit des beobachteten Effektes zu untersuchen (s. Abbildung 24). Dabei fand jeweils die Maximalkonzentration (10 nM TCDD, 1 μ M B[a]P (s. o.)) sowie 1/10 dieser Konzentration (1 nM TCDD, 0,1 μ M B[a]P) über 72 h Verwendung. Die Daten zur statistischen Auswertung sind in Tabelle 14 zu finden. Wiederum wird in beiden Diagrammen die Folsäureaufnahme in den unbehandelten Kontrollzellen durch die schwarze Kurve repräsentiert. Wie in Diagramm A ersichtlich ist, führte auch die Inkubation mit 1 nM TCDD über 72 h zu einer signifikanten Reduktion der Folsäureaufnahme um 38,67 % im Vergleich zu den unbehandelten LS180-Zellen. Das entspricht einer Aufnahmegeschwindigkeit V_{influx} von $51,74 \pm 2,7$ pmol/mg Protein/min. Damit fiel die

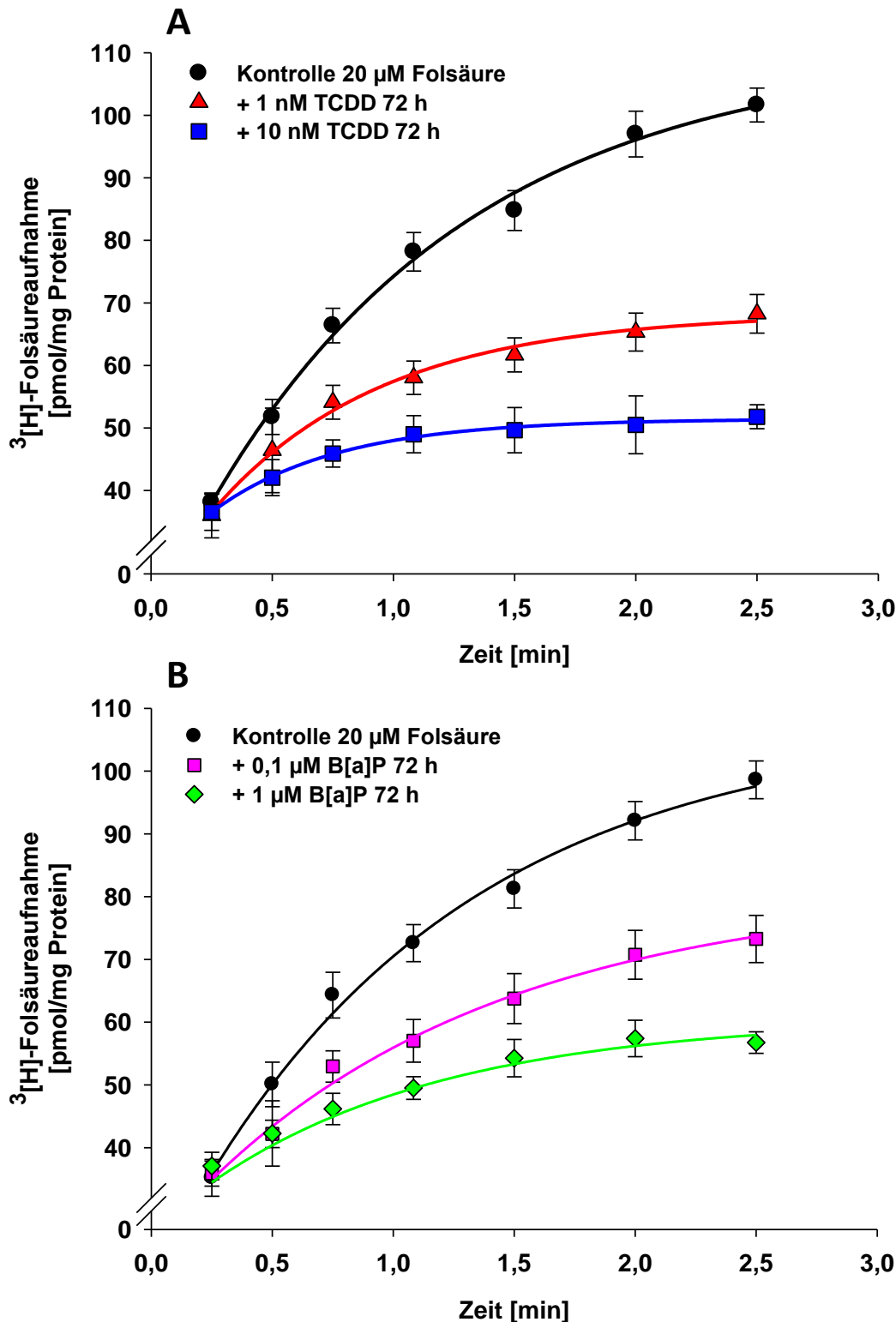


Abbildung 24: Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch TCDD oder B[a]P in Abhängigkeit von der Dosis

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 nM bzw. 10 nM TCDD (A) oder 0,1 bzw. 1 µM B[a]P (B) für 72 h. Anschließend wurde mittels Messung der aufgenommenen Menge an $^3\text{[H]}$ -Folsäure im Flüssigszintillator bei $t = 0,25; 0,5; 0,75; 1,08; 1,5; 2,0$ und 2,5 min die $^3\text{[H]}$ -Folsäureaufnahme (20 µM) bestimmt und eine nichtlineare Regressionskurve erstellt. Dabei ist jeweils der Mittelwert \pm SEM in pmol/mg Protein ($n = 12$) dargestellt. Die Daten zur statistischen Auswertung sind in Tabelle 14 zu finden.

Reduktion der carriervermittelten Folsäureaufnahme niedriger aus als nach Verwendung der 10-fachen Konzentration an TCDD (blaue Kurve), was sich am signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kurven widerspiegelt (s. Tabelle 14). Der Unterschied in der Aufnahmegeschwindigkeit zwischen 1 nM und 10 nM TCDD beträgt 31,70 %. Ein vergleichbares Bild stellt sich auch in Diagramm B dar, in dem die dosisabhängigen Effekte auf die Folsäureaufnahme nach einer Vorbehandlung mit B[a]P abgebildet sind. Die Inkubation der Zellen mit 0,1 μ M B[a]P über 72 h führte zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Transportaktivität um 34,82 % in Relation zur unbehandelten Kontrolle, der V_{influx} betrug $55,5 \pm 3,1$ pmol/mg Protein/min. Auch mit B[a]P ließ sich beim Einsatz der höheren Substanzkonzentration (1 μ M) eine stärkere Abnahme der Folsäureaufnahme beobachten (V_{influx} : $31,21 \pm 1,5$ pmol/mg Protein/min). Jedoch war zwischen den beiden Konzentrationen B[a]P nur beim Endpunkt nach 2,5 min (Wert 7) ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar (s. Tabelle 14). Wenn man diese beiden Versuche zusammenfasst, lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Reduktion der carriervermittelten Folsäureaufnahme in dem gewählten Versuchsansatz bei beiden Substanzen deutlich dosisabhängig ist.

Tabelle 14: Statistische Daten zur Modulation der Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch TCDD oder B[a]P in Abhängigkeit von der Dosis

Dargestellt sind die Signifikanzen, die mittels einer One-Way Anova und Holm-Sidak Post-hoc Test zwischen den einzelnen Messpunkten der Kurven zu den verschiedenen Zeitpunkten (Wert 1 - 7) ermittelt wurden. Sternchen repräsentieren statistische Signifikanz in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) und Rauten Signifikanz zwischen den behandelten Zellen der niedrigen und der hohen Konzentration der CYP P450-Induktoren untereinander (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$). Die Abkürzung n. s. (nicht signifikant) bedeutet, dass sich weder zu den Kontrollzellen noch untereinander signifikante Unterschiede ergaben ($p > 0,05$).

	1 nM TCDD 72 h	10 nM TCDD 72 h	0,1 μ M B[a]P 72 h	1 μ M B[a]P 72 h
Wert 1 (0,25 min)	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Wert 2 (0,5 min)	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Wert 3 (0,75 min)	*** #	*** #	n. s.	n. s.
Wert 4 (1,08 min)	*** #	*** #	n. s.	**
Wert 5 (1,5 min)	*** ##	*** ##	**	***
Wert 6 (2,0 min)	*** ##	*** ##	***	***
Wert 7 (2,5 min)	*** ###	*** ###	*** #	*** #

4.2.3.2 Modulation in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Im nächsten Schritt wurden Untersuchungen zur Modulation der funktionellen Folsäuretransportaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer durchgeführt. Zum Einsatz kam die höhere Konzentration beider AHR-Liganden über einen Zeitraum von 24, 72 oder 120 h. Die aus den Transportversuchen resultierenden Regressionskurven sind in Abbildung 25 ersichtlich und die Daten zu den statistischen Berechnungen sind im Anhang II in Tabelle A2 zu finden. Wenn die LS180-Zellen mit 10 nM TCDD inkubiert wurden (Diagramm A), konnte bereits nach 24 h eine signifikante Abnahme der funktionellen Folsäureaufnahme um 28,02 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen beobachtet werden. Diese Reduktion war nach einer Inkubationszeit von 72 h mit 66,36 % noch deutlicher ausgeprägt (V_{influx} : $29,56 \pm 0,6$ pmol/mg Protein/min) und lag nach 120 h in etwa auf dem gleichen Niveau (V_{influx} : $24,59 \pm 0,8$ pmol/mg Protein/min). Bis auf den letzten Messwert nach 2,5 min konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ergebnissen nach

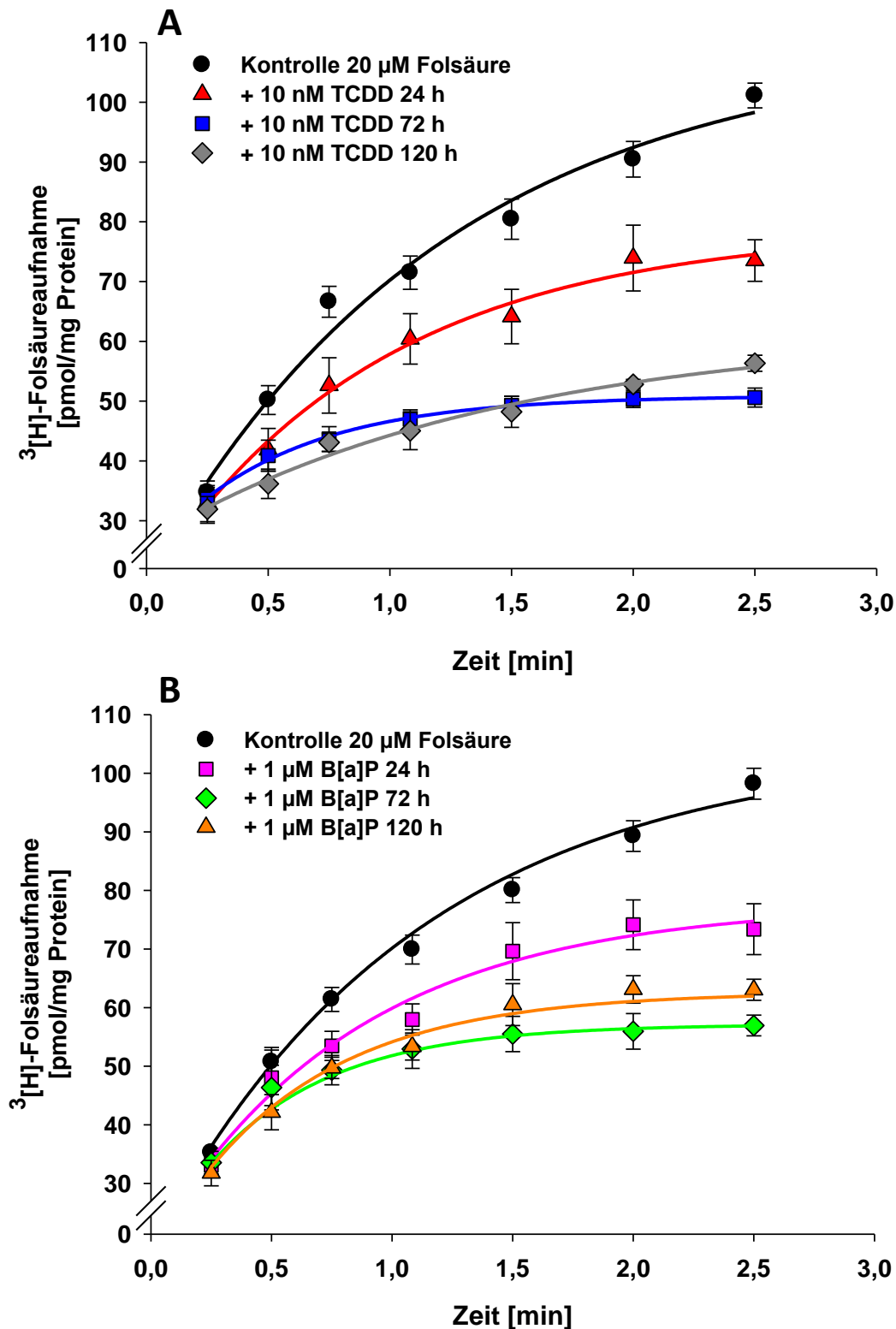


Abbildung 25: Einfluss von AhR-Agonisten auf die funktionelle Folsäureaufnahme in LS180-Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 10 nM TCDD über 24/72/120 h (A) oder 1 µM B[a]P über 24/72/120 h (B). Anschließend wurden die Zellen in Suspension verbracht und nach Zugabe von 20 µM Folsäure im Heiß-Kalt-Gemisch die zellassozierte Radioaktivität mittels Flüssigszintillationsmessung bestimmt und eine nichtlineare Regressionskurve erstellt. Die Probenentnahme fand bei $t = 0,25; 0,5; 0,75; 1,08; 1,5; 2,0$ und $2,5$ min statt. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SEM ($n = 12$). Statistische Signifikanz wurde mittels One-Way Anova und Holm-Sidak Post-hoc Test ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle A2 (Anhang II) zu finden.

72 h und 120 h ermittelt werden (s. Tabelle A2, Anhang II). Hingegen ergaben sich zwischen den Kontrollzellen und allen Inkubationszeiten sowie zwischen 24 h und 72 h ebenso wie zwischen 24 h und 120 h statistisch signifikante Unterschiede. Wiederum zeigte sich ein ähnliches Bild nach einer Inkubation mit 1 μM B[a]P, dargestellt in Diagramm B. Wie man erkennen kann, fiel bei B[a]P auch der zeitabhängige Effekt etwas schwächer aus. Auch hier ließen sich bereits nach einer Inkubationszeit von 24 h (V_{influx} : $69,89 \pm 1,3$ pmol/mg Protein/min) signifikante Differenzen zu den Messwerten in den unbehandelten Kontrollzellen (V_{influx} : $83,69 \pm 1,7$ pmol/mg Protein/min) beobachten. Dies entspricht einer Reduktion um 16,5 %. Die Messwerte nach 72 h und 120 h lagen wiederum auf einem vergleichbaren Niveau, was sich in V_{influx} -Werten von $39,30 \pm 0,4$ und $44,73 \pm 0,5$ pmol/mg Protein/min widerspiegelt. Zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten waren keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar. Eine Ausnahme bilden Wert 6 und 7 zwischen 24 h und 72 h Inkubation mit 1 μM B[a]P.

4.2.3.3 Einfluss von TCDD und B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten

Um den Regulationsweg der beobachteten Effekte näher zu beleuchten, wurden die Zellen im letzten Schritt der Untersuchungsreihe mit den beiden Cytochrom P450-Induktoren TCDD und B[a]P und zusätzlich mit zwei verschiedenen AhR-Antagonisten vorbehandelt.

Zum einen fand für diesen Versuch Salicylamid (SAL) Verwendung. Für dieses Salicylsäurederivat, dass in der Humanmedizin bereits seit langem als Antiphlogistikum eingesetzt wird, konnte eine potente,

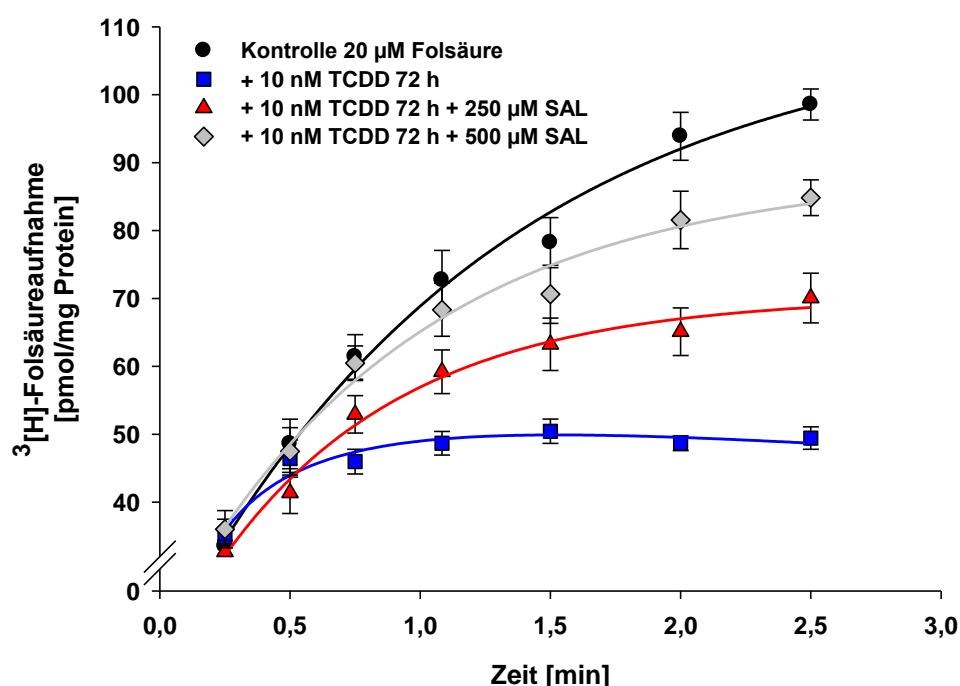


Abbildung 26: Modulation der funktionellen Folsäureaufnahme durch TCDD und Salicylamid

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät ($1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte eine Vorbehandlung mit 10 nM TCDD für 72 h oder 250 bzw. 500 μM SAL (2 h) und anschließend 10 nM TCDD für 72 h. Im Anschluss wurden Aufnahmeversuche mit Tritium-markierter Folsäure durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 8$). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind separat in Tabelle A3 (Anhang II) wiedergegeben.

dosisabhängige, langandauernde Hemmung der TCDD-induzierten AhR-Signaltransduktion nachgewiesen werden (MACDONALD et al. 2004). Im WST-1-Viabilitätstest wurde für SAL über einen großen Dosisbereich kaum ein Effekt auf die Zellviabilität in den LS180-Zellen beobachtet (s. 4.1.1.3), so dass für die folgenden Aufnahmeversuche die Substanzkonzentrationen und Inkubationszeiten aus der oben genannten Studie übernommen wurden. Die Zellen wurden für diese Aufnahmeversuche wie bereits beschrieben in Zellkulturschalen zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausgesät und für 24 h im Brutschrank belassen. Im Anschluss erfolgte zunächst für 2 h eine Präinkubation mit 250 oder 500 μM SAL und dann die Zugabe von 10 nM TCDD für insgesamt 72 h. Als Kontrolle dienten unbehandelte LS180-Zellen sowie ausschließlich mit 10 nM TCDD (72 h) behandelte Zellen. Die V_{influx} -Werte dieser zwei Kontrollgruppen lagen mit $83,55 \pm 3,0$ pmol/mg Protein/min (unbehandelt) und $26,20 \pm 2,6$ pmol/mg Protein/min (10 nM TCDD 72 h) im Bereich der vorangegangenen Versuche. Bei einer zusätzlichen Präinkubation mit 250 μM SAL (rote Kurve, Abbildung 26) stieg der V_{influx} -Wert im Vergleich zur Inkubation ausschließlich mit TCDD um 35,1 % auf $55,49 \pm 3,7$ pmol/mg Protein/min. Durch eine Präinkubation mit 500 μM SAL wurde dieser Effekt nochmals gesteigert (V_{influx} : $72,66 \pm 4,3$ pmol/mg Protein/min). In diesem Versuchsansatz konnte mit dem AhR-Antagonisten SAL die durch TCDD vermittelte Reduktion der carriervermittelten Folsäufnahme zu einem großen Teil dosisabhängig rückgängig gemacht werden. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind in Tabelle A3 (Anhang II) zu finden.

Als zweiter Antagonist wurde die als CH-223191 (CH) bezeichnete synthetische Substanz 1-Methyl-N-{2-methyl-4-[2-(2-methylphenyl)diazen-1-yl]phenyl}-1H-pyrazol-5-carboxamid verwendet. Diese Verbindung

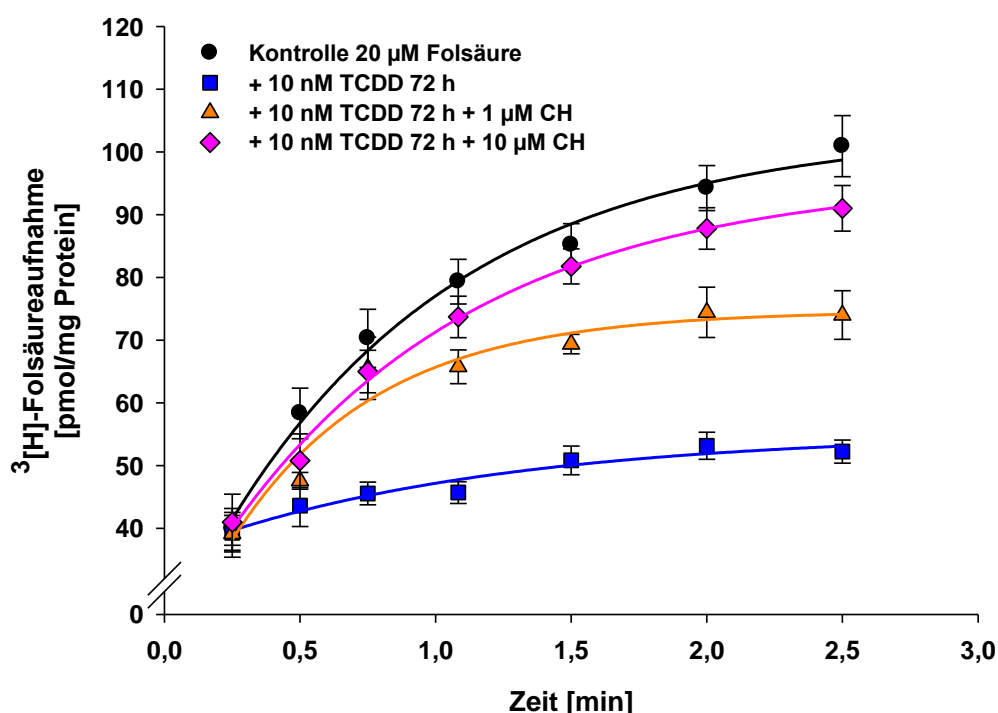


Abbildung 27: Einfluss von TCDD in Kombination mit CH 223191 auf die funktionelle Folsäufnahme in LS180-Zellen

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät ($1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) und 24 h im Brutschrank kultiviert. Inkubiert wurden die Zellen mit TCDD (10 nM, 72 h) oder 1 bzw. 10 μM CH für 2 h und anschließend 10 nM TCDD für 72 h. Im Anschluss erfolgten Aufnahmestudien mit ^3H -Folsäure und eine Kurvenanpassung mittels nichtlinearer Regression. Abgebildet ist der Mittelwert \pm SEM ($n = 8$), die statistischen Daten sind in Tabelle A3 (Anhang II) zu finden.

konnte von KIM et al. (2006) als spezifischer potenter Inhibitor der TCDD-induzierten AhR-abhängigen Transkription identifiziert werden. Dabei verhindert CH sowohl die Bindung von TCDD an den AhR, als auch die TCDD-induzierte Translokation in den Zellkern und die Bindung an die DNA. Auch bei diesem Versuch erfolgte zunächst für 2 h eine Präinkubation mit 1 oder 10 μM CH und dann die Zugabe von 10 nM TCDD für insgesamt 72 h. Als Kontrolle dienten wiederum unbehandelte Zellen sowie nur mit 10 nM TCDD (72 h) behandelte Zellen. Die eingesetzten CH-Konzentrationen sowie die Inkubationszeit wurden anhand der Toxizitätsstudien sowie der Literaturquelle ausgewählt. Wie Abbildung 27 zu entnehmen ist, konnte auch unter Verwendung von CH eine signifikante dosisabhängige Umkehr der durch TCDD vermittelten Reduktion der funktionellen Folsäureaufnahme in den LS180-Zellen ermittelt werden. Bei einer Präinkubation mit 10 μM CH lagen die Ergebnisse nahezu auf Kontrollniveau (V_{influx} Ko: $90,52 \pm 1,5$ pmol/mg Protein/min, V_{influx} 10 μM CH: $80,22 \pm 2,5$ pmol/mg Protein/min), so dass sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben (s. Tabelle A3, Anhang II).

Für B[a]P wurde dieser Versuch mit der jeweils höheren Konzentration der beiden AhR-Antagonisten durchgeführt. Die Vorbehandlung erfolgte nach demselben Schema wie bereits bei TCDD beschrieben, allerdings mit 1 μM B[a]P statt 10 nM TCDD. In Abbildung 28 sind die resultierenden Regressionskurven nach Durchführung der Aufnahmeversuche abgebildet. In den Kontrollzellen (Schwarz) sowie in den Zellen, die mit 1 μM B[a]P für 72 h behandelt wurden, lag die initiale Aufnahmegeschwindigkeit wiederum in

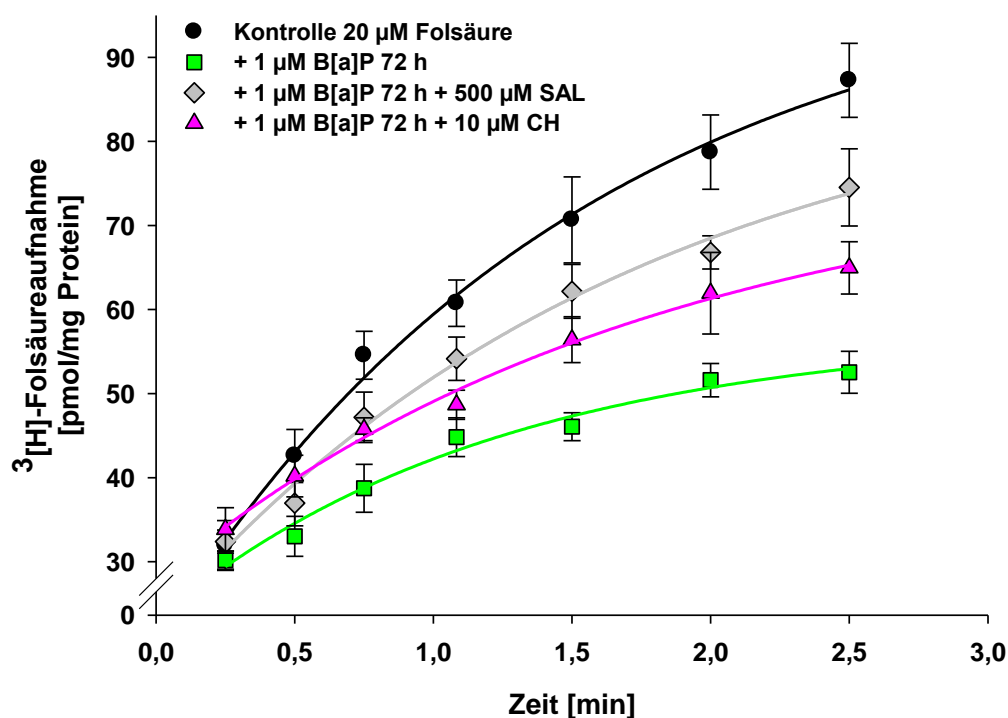


Abbildung 28: Modulation der funktionellen Folsäureaufnahme in LS180-Zellen durch B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten

LS180-Zellen wurden mit 1 μM B[a]P über 72 h oder 500 μM SAL bzw. 10 μM CH und anschließend 1 μM B[a]P über 72 h vorbehandelt. Im Anschluss erfolgten Aufnahmeversuche mit Tritium-markierter Folsäure in Suspension. Aliquots wurden bei $t = 0,25; 0,5; 0,75; 1,08; 1,5; 2,0$ und 2,5 min entnommen und die intrazelluläre Radioaktivität in Bezug zur Proteinmenge bestimmt. Aus den Daten wurden nichtlineare Regressionskurven erstellt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM ($n = 8$). Die statistischen Daten sind separat in Tabelle A4 (Anhang II) wiedergegeben.

einem ähnlichen Bereich wie in den vorangegangenen Versuchen (s. 4.2.3.1). Durch eine Präinkubation mit 500 μ M SAL (Grau) ließ sich eine signifikante Umkehr des B[a]P-vermittelten Effektes erreichen (V_{influx} : $57,32 \pm 2,71$ pmol/mg Protein/min). Im Gegensatz dazu stieg der V_{influx} -Wert nach einer Vorbehandlung mit 10 μ M CH nur um 21,3 % auf $43,60 \pm 3,2$ pmol/mg Protein/min im Vergleich zur ausschließlichen Inkubation mit B[a]P. Daher konnten auch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen ermittelt werden. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ergaben sich jedoch signifikante Differenzen (s. Tabelle A4, Anhang II).

4.3 Quantifizierung der RFC- und PCFT-mRNA in LS180-Zellen

Um den Mechanismus der TCDD und B[a]P-bedingten Regulation der Folsäureaufnahme zu evaluieren, wurde abschließend die Expression der Zielgene (RFC, PCFT) in den LS180-Zellen mittels einer qRT-PCR unter Verwendung von spezifischen TaqMan®-Sonden untersucht. Diese bieten den Vorteil eines sehr hohen Spezifitätsniveaus, da zur Entstehung eines Fluoreszenzsignals sowohl die beiden Primer als auch die Sonde an der Zielsequenz binden müssen (MORRIS et al. 1996). Für die Normalisierung der Genexpressionsdaten wurden auch die Transkriptmengen des Housekeeping-Gens β -Actin in den Zellen bestimmt.

Für die Durchführung der Genexpressionsanalysen wurden die LS180-Zellen zu $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Substanzen über einen Zeitraum von 24 - 120 h vorbehandelt (s. 3.2.1.3). Nach der Herstellung der Zellpellets wurde daraus die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Im Anschluss erfolgte die qRT-PCR (s. 3.2.2.6). Die Auswahl der Primer und der Sonden erfolgte auf Grundlage von NCBI-Datenbankeinträgen (RFC: NM_194255.2, PCFT: BC010691, β -Actin: NM_001101.3) unter Berücksichtigung verschiedener Merkmale wie Schmelztemperatur und GC-Gehalt. Die Fragmentlänge der PCR-Produkte lag zwischen 121 und 138 bp (s. Tabelle 5 in 3.1.4).

4.3.1 Generierung der Standardreihen

In Vorbereitung auf diese Versuche wurden zunächst Standardreihen für die absolute Quantifizierung der Zielsequenzen (RFC, PCFT) generiert. Dafür wurde eine spezifische Nukleotidsequenz des jeweiligen Transporters, die das in der qRT-PCR untersuchte Fragment umfasste, in ein Plasmid ligiert und nachfolgend in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert (s. Tabelle 5 sowie 3.2.2.5). Nach der Vermehrung und Isolierung der Plasmid-DNA mittels Mini-Präparation erfolgte der Nachweis der Sequenzintegrität über asymmetrische Restriktionsschnitte am Plasmid und die Auftrennung auf einem 1%igen Agarosegel (s. 3.2.2.5). Wie in Abbildung 29 beispielhaft dargestellt, wurden mehrere Klone in einem Versuchsdurchgang untersucht. In der oberen Darstellung (A) sind 6 verschiedene RFC-Klone (R1 - 6) dargestellt, die nach Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und StuI (s. Tabelle 10) elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Alle Klone zeigten ein großes Fragment bei 2,9 kb und ein kleineres Fragment bei 0,7 kb. Da der Vektor eine Größe von 3 kb und das Insert eine Größe von 0,6 kb hat, konnte somit die Integrität des

Inserts festgestellt werden. Allerdings wurde das Insert mit der falschen Orientierung eingebaut, was aber für die Fragestellung in dieser Studie nicht relevant war. Die untere Darstellung (B) zeigt 6 verschiedene PCFT-Klone (P1 - 6). Hier wurden für den Restriktionsschnitt die Enzyme HindIII und NheI verwendet (s. Tabelle 10). Bei Klon 1 und 5 konnte durch ein größeres Fragment bei 2,7 kb und ein kleineres Fragment bei 1 kb ein Insert nachgewiesen werden. Die restlichen 4 Klone zeigten jedoch kein Insert.

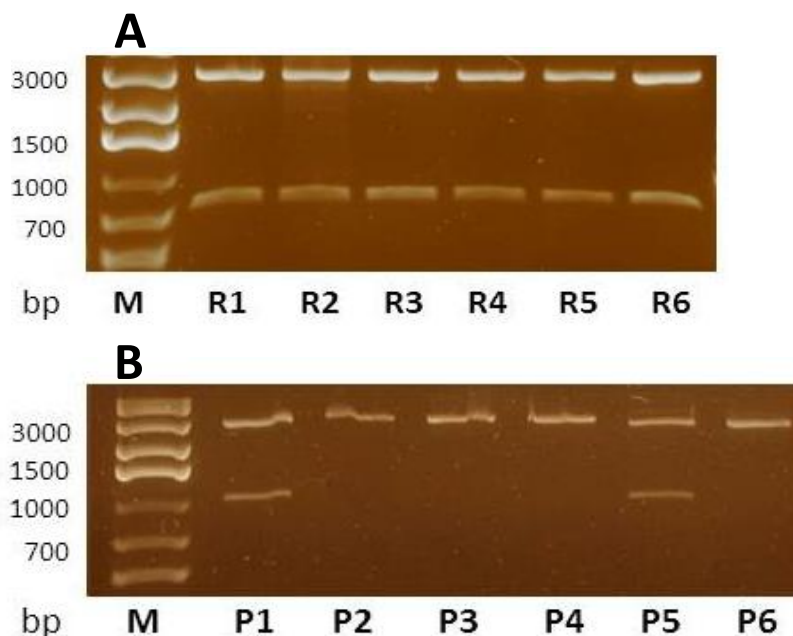


Abbildung 29: Restriktionsschnitt der Plasmid-DNA

Eine Nukleotidsequenz der Transporter RFC und PCFT (RFC: 570 bp, PCFT: 779 bp) wurde jeweils in ein Plasmid (2974 bp) ligiert und nachfolgend in kompetente *E.coli*-Bakterien transformiert. Die Plasmid-DNA verschiedener RFC- bzw. PCFT-Klone wurde mittels Mini-Präparation isoliert und ein Restriktionsdoppelverdau (RFC: HindIII/StuI, PCFT: HindIII/NheI) durchgeführt. Die Schnittstelle von HindIII befindet sich im Vektor und die Schnittstellen von StuI bzw. NheI im Insert. Die resultierenden Fragmente wurden vermischt mit Gel Loading Dye auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. R1 - 6 in Darstellung A bezeichnen 6 verschiedene RFC-Klone und P1 - 6 unterschiedliche PCFT-Klone in Darstellung B. Als Größenmarker (M) wurde der MassRuler verwendet.

Die RFC-Klone 1 und 3 sowie die PCFT-Klone 1 und 5 wurden nochmals vermehrt und anschließend eine Midi-Präparation der Plasmid-DNA durchgeführt (s. 3.2.2.5). Zur Kontrolle erfolgte ein Restriktionsdoppelverdau mit HindIII und NotI (s. Tabelle 10). Im Gegensatz zum vorher verwendeten Restriktionsschnitt war dieser symmetrisch, da beide Enzyme im Vektor schneiden. Es konnten spezifische Fragmente für die RFC-Klone mit 2,7 kb bzw. 0,9 kb und für die PCFT-Klone mit 2,7 kb bzw. 1,1 kb nachgewiesen werden (s. Abbildung 30, A). Bei R1 sowie P1 und P5 war auf dem Agarosegel noch eine zusätzliche Bande bei 3,5 bzw. 3,8 kb erkennbar, die jeweils unverdautes Plasmid repräsentiert. Nachfolgend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA für beide Zielgene auf 1 µg/µl eingestellt und eine Verdünnungsreihe erstellt.

Abschließend wurde mit der aufgereinigten Plasmid-DNA eine RT-PCR mit den Primern für die qRT-PCR durchgeführt (s. Tabelle 4 in 3.1.4). Dabei wurden die Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 der Plasmid-DNA verwendet. Bei beiden RFC bzw. PCFT-Klonen ergab sich eine spezifische Bande mit 136 bzw. 121 bp, die in den Negativkontrollen (-) nicht auftrat (s. Abbildung 30, B + C). In den Negativkontrollen konnte man stattdessen jeweils am Ende der Laufbahn eine verschwommene Bande erkennen. Dabei handelt es sich um sogenannte „Primerwolken“, die durch unverbrauchte Primer entstehen.

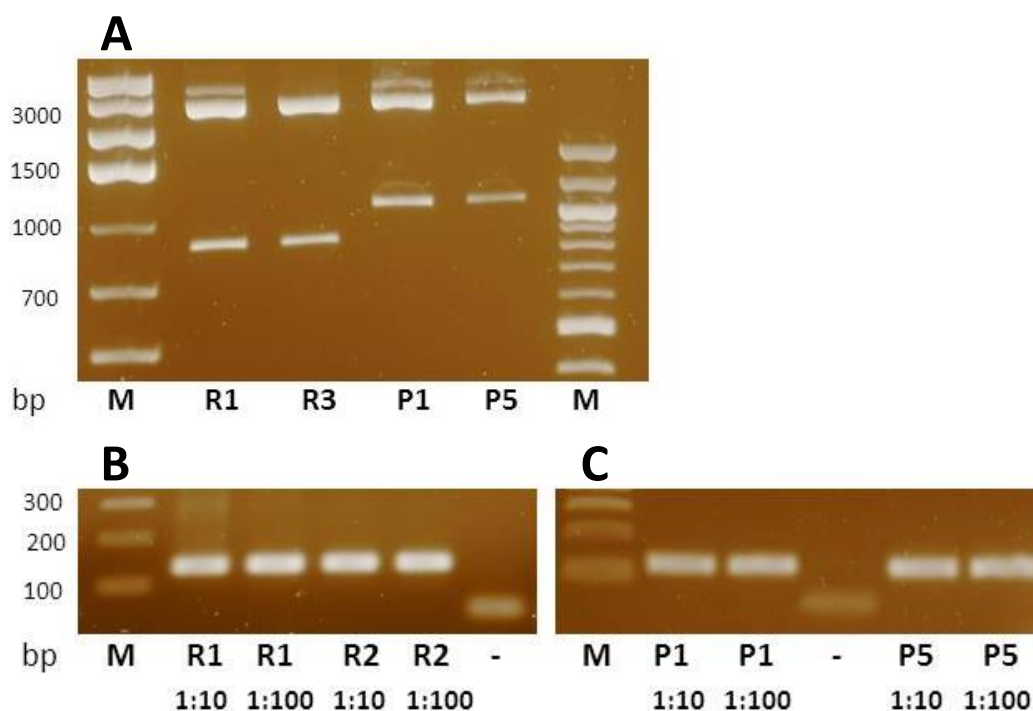


Abbildung 30: Kontrolle der RFC- und PCFT-Klone mittels Restriktionsschnitt und RT-PCR

Die Plasmid-DNA von zwei ausgewählten RFC- (R1, R3) und PCFT-Klonen (P1, P5) wurde mittels Midi-Präparation isoliert und anschließend ein Restriktionsdoppelverdau (HindIII/NotI) durchgeführt. Die Schnittstellen von HindIII und NotI befanden sich jeweils im Plasmid. In Darstellung A sind die resultierenden Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem 1%igen Agarosegel dargestellt. Marker (M) links ist der Massruler, rechts der 100 bp-DNA Ladder. Im unteren Abschnitt (B + C) wurde mit der auf 1 µg/µl eingestellten Plasmid-DNA (Verdünnung 1:10 oder 1:100) eine RT-PCR unter Verwendung der qRT-PCR-Primer für den RFC (Darstellung B) und den PCFT (Darstellung C) durchgeführt (s. Tabelle 4). Mit beiden Verdünnungsstufen ergab sich eine spezifische Bande. In der Negativkontrolle (-) ist jeweils eine sogenannte „Primerwolke“ zu erkennen. Als Größenmarker (M) wurde der 100 bp-DNA Ladder verwendet.

4.3.2 Modulation der Genexpression von RFC und PCFT durch AhR-Liganden

4.3.2.1 Dosisabhängige Genexpressionsmuster

Für diese Versuche wurden die LS180-Zellen 72 h mit den AhR-Agonisten TCDD oder B[a]P inkubiert. Es wurden die gleichen Substanzkonzentrationen wie in den Aufnahmestudien verwendet (s. 4.2.3), also 1 und 10 nM TCDD sowie 0,1 und 1 µM B[a]P. In Abbildung 31 ist jeweils die relative Genexpression in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (100 %) dargestellt. Die schwarzen Balken repräsentieren in allen Abbildungen jeweils die Expression des RFC und die grauen Balken die Expression des PCFT.

Im linken Diagramm (A) ist die Modulation der Genexpression durch TCDD abgebildet. Die Inkubation der Zellen mit 1 nM für 72 h führte zu einer Reduktion um 18,36 % ± 6,25 (RFC) bzw. 21,69 % ± 12,06 (PCFT). Diese Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant verschieden zur Kontrolle. Mit der höheren Dosis des AhR-Induktors ergab sich eine deutliche, signifikante Verminderung der mRNA-Expression für beide Transportproteine (38,78 % ± 4,99 bzw. 50,46 % ± 10,73). Die Reduktion der Transkriptmengen des PCFT war in diesem Versuchsansatz geringfügig stärker ausgeprägt als die Herabregulierung des RFC. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant verschieden voneinander. Die mRNA-Expression beider Transporter lag in den LS180-Zellen auf einem ähnlichen, relativ niedrigen Niveau, im Bereich der

Standardreihe von 1×10^{-5} bis 1×10^{-6} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Variabilität der β -Actin-Expression war in den verschiedenen Experimenten gering.

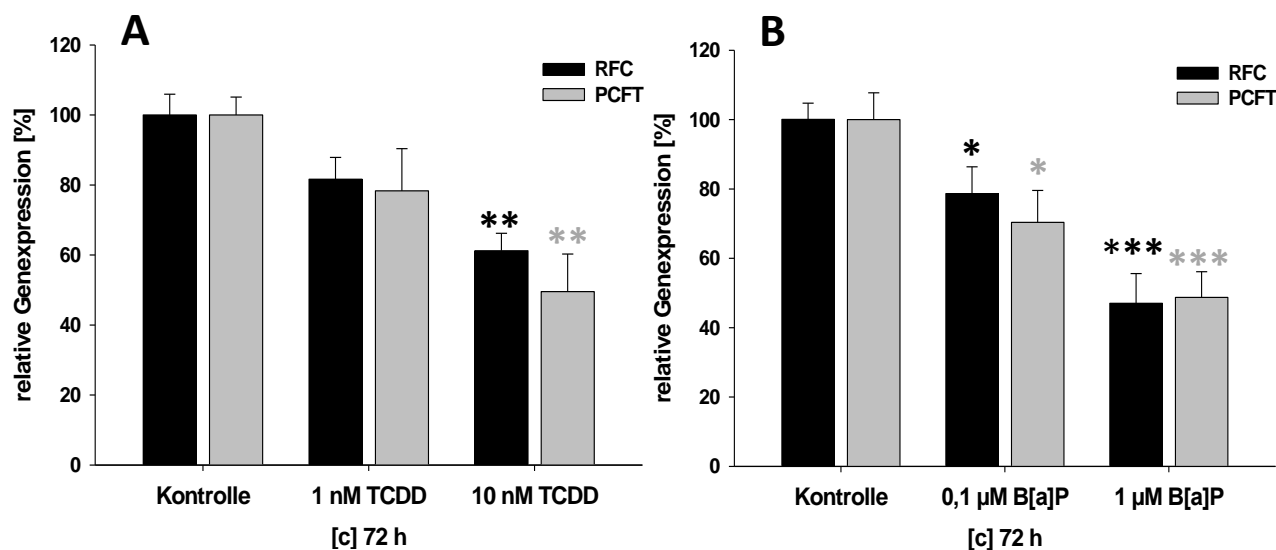


Abbildung 31: Modulation der Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen durch AhR-Agonisten nach 72 h in Abhängigkeit von der Substanzdosis

Die Genexpressionsanalyse der Folattransporter RFC und PCFT ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ cDNA) erfolgte nach Vorbehandlung der LS180-Zellen mit 1 oder 10 nM TCDD bzw. 0,1 oder $1 \mu\text{M}$ B[a]P über 72 h. Dafür wurde die RNA der LS180-Zellen isoliert (s. 3.2.2.1) und in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.2.2). Die Genexpression von RFC und PCFT wurde mit einer TaqMan® qRT-PCR ermittelt und prozentual in Relation zu den unbehandelten Kontrollzellen (100 %) gesetzt. Zur Normalisierung der Analysedaten wurden die Transkriptmengen des Housekeeping-Gens β -Actin verwendet. Die Analyse erfolgte anhand der $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode. Die Balken repräsentieren $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n = 16$ aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wurde anhand einer One-Way Anova mit Holm-Sidak Post-hoc Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Die mRNA-Expression der Folattransporter RFC und PCFT wurde untereinander ebenfalls mit einer One-Way Anova mit Holm-Sidak Post-hoc Test untersucht. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant verschieden voneinander.

Im rechten Diagramm (B) der Abbildung 31 sind die Ergebnisse nach Inkubation mit B[a]P über 72 h zu finden. Die Reduktion der Expression mit der niedrigeren Substanzdosis fiel im Gegensatz zu TCDD mit $21,36 \% \pm 7,71$ (RFC) bzw. $29,62 \% \pm 9,19$ (PCFT) etwas deutlicher und auch signifikant aus. Mit $52,96 \% \pm 8,58$ bzw. $51,27 \% \pm 7,41$ ließ sich bei $1 \mu\text{M}$ B[a]P ein noch deutlicherer Rückgang der mRNA-Menge beobachten. Wiederum gab es zwischen den Folatcarriern PCFT und RFC in den einzelnen Versuchsansätzen keine signifikanten Unterschiede.

Da sich bei der niedrigen Substanzdosis TCDD die Genexpressionsdaten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle als nicht signifikant erwiesen hatten, ein Trend jedoch deutlich zu erkennen war, wurde dieser Versuch nun mit einer Inkubationszeit von 120 h und den gleichen Konzentrationen an AhR-Agonisten wie zuvor durchgeführt (s. Abbildung 32). Im Diagramm A sind wieder die Analysedaten nach Behandlung der LS180-Zellen mit TCDD dargestellt. Im Vergleich zu den Ergebnissen nach 72 h führte hier eine Konzentration von 1 nM TCDD zu einer stärkeren, statistisch signifikanten Verminderung der Transkriptmenge sowohl vom RFC (Reduktion um $36,33 \% \pm 6,72$) als auch vom PCFT (Reduktion um $43,93 \% \pm 9,74$) in Bezug zu den unbehandelten Kontrollzellen. Nach 120 h Behandlungszeit fiel der Unterschied zwischen 1 nM und 10 nM TCDD deutlicher geringer aus als nach einer Inkubationszeit von 72 h. Die Expressionswerte beider Carrier wiesen nach einer Inkubation mit 10 nM TCDD eine starke Verminderung um $68,67 \% \pm 10,91$ (RFC) bzw. $61,97 \% \pm 9,46$ (PCFT) auf.

Im Diagramm B sind die mRNA-Werte nach einer Behandlung der LS180-Zellen mit 0,1 oder 1 μM B[a]P über 120 h abgebildet (s. Abbildung 32). Bereits mit der niedrigen Substanzkonzentration von 0,1 μM B[a]P waren die Transkriptmengen insbesondere vom PCFT statistisch signifikant um fast 60 % reduziert. Mit der höheren Konzentration von 1 μM B[a]P ergab sich nur noch eine mäßige Steigerung dieses Effektes. Mit beiden AhR-Agonisten konnte eine maximale Reduktion auf ca. 35 % der ursprünglichen mRNA-Mengen von RFC und PCFT in den Kontrollzellen beobachtet werden. Auch in diesem Versuch wurden zwischen den mRNA-Mengen der Folatcarrier PCFT und RFC in den einzelnen Versuchsansätzen keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt (s. Abbildung 32).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Vorbehandlung mit TCDD oder B[a]P bei beiden untersuchten Folatcarriern zu verminderten Transkriptraten führt. Dabei war auch, insbesondere nach 72 h, ein dosisabhängiger Einfluss sichtbar. Somit scheinen die in den Aufnahmeversuchen dargestellten Effekte zumindest zum Teil auf einer transkriptionellen Regulation zu beruhen.

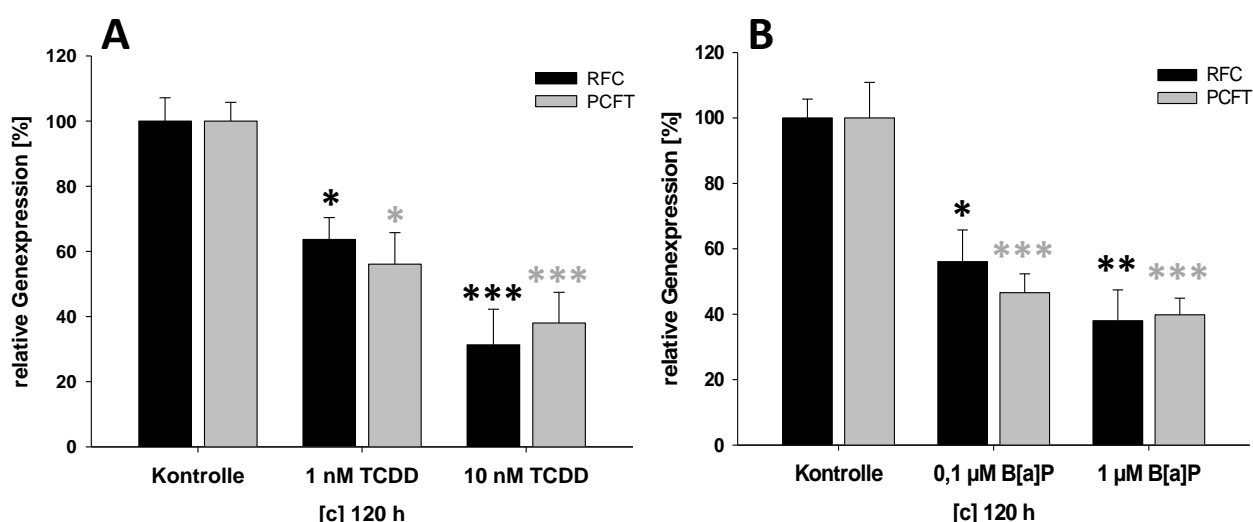


Abbildung 32: Modulation der Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen durch AhR-Agonisten nach 120 h in Abhängigkeit von der Dosis

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen kultiviert und über 120 h mit verschiedenen Konzentrationen TCDD (A) oder B[a]P (B) behandelt. Im Anschluss wurde die LS180-RNA isoliert (s. 3.2.2.1) und 1 μg RNA in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.2.2). Die Transkriptmengen von RFC und PCFT wurden durch eine TaqMan® qRT-PCR bestimmt, wobei 1 μg RNA sowie humanspezifische Primer und Sonden eingesetzt wurden. Die relativen mRNA-Mengen werden prozentual im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (100 %) dargestellt. Als interner Standard fand β -Actin Verwendung. Die Daten wurden mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode analysiert und repräsentieren den Mittelwert \pm SEM ($n = 8$). Die statistische Auswertung erfolgte anhand einer One-Way Anova mit Holm-Sidak Post-hoc Test im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) sowie der beiden Folattransporter untereinander. Die Unterschiede zwischen RFC und PCFT waren jedoch nicht signifikant verschieden voneinander.

4.3.2.2 Zeitabhängige Genexpressionsmuster

Analog zu den Aufnahmeversuchen erfolgte im nächsten Schritt die Untersuchung der zeitabhängigen Effekte im Genexpressionsmuster beider Folattransporter in den LS180-Zellen. Verwendet wurden 10 nM TCDD oder 1 μM B[a]P über 24, 72 oder 120 h.

In Abbildung 33 ist der Verlauf der Genexpression der beiden Folattransporter über die Zeit nach Inkubation mit TCDD dargestellt. Wie bereits nach den Ergebnissen der dosisabhängigen Versuche

vermutet, konnte mit steigender Inkubationsdauer ein kontinuierliches Absinken der Transkriptmengen von RFC und PCFT beobachtet werden. Nach 24 h stellte sich insbesondere beim RFC mit einer relativen Genexpression von $92,82\% \pm 9,78$ kaum eine Veränderung im Vergleich zu den Kontrollzellen dar. Nach 72 h ließ sich jedoch ein deutlicher Einfluss auf die Genexpression beobachten. Signifikante Differenzen ergaben sich für den PCFT für 72 h und 120 h in Relation zur Kontrolle. Beim RFC war das nur für eine Inkubationsdauer von 120 h der Fall.

Die relativen Transkriptmengen vom PCFT waren in diesem Versuch bei jedem Inkubationszeitraum deutlich niedriger als die des RFC. Doch obwohl hier die Differenzen zwischen den Folatcarriern relativ ausgeprägt erschienen, ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede (s. Abbildung 33).

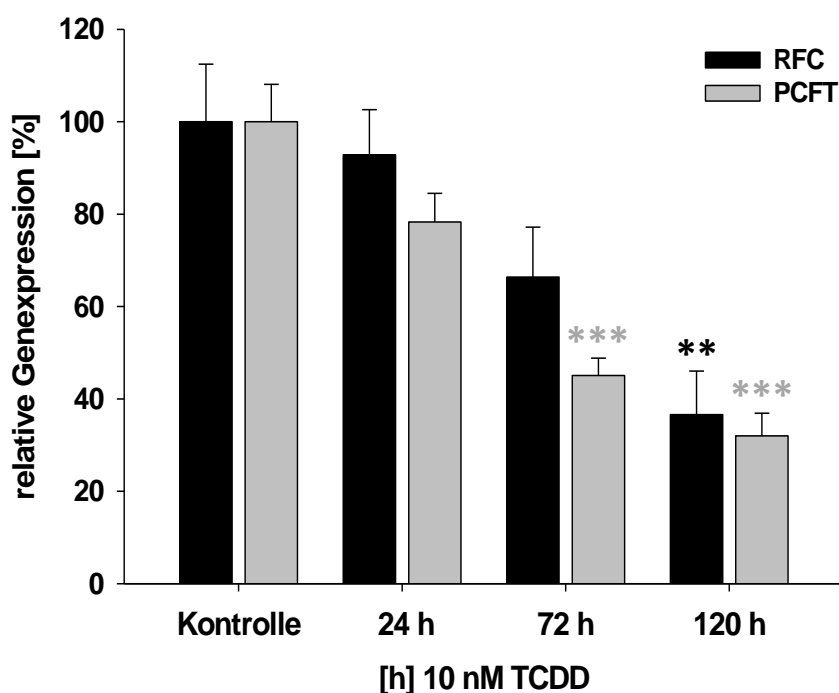


Abbildung 33: RFC- und PCFT-Genexpression in LS180-Zellen nach Inkubation mit 10 nM TCDD über 24 – 120 h

LS180-Zellen wurden mit 10 nM TCDD über 24, 72 oder 120 h inkubiert. Die Bestimmung der Transkriptmengen von RFC und PCFT erfolgte nach Isolation der RNA und dem Umschreiben in cDNA durch eine qRT-PCR in 96-Well PCR-Platten. Die Balken im Diagramm stellen die relativen mRNA-Mengen ($MW \pm SEM$, $n = 8$) in Relation zu den unbehandelten Kontrollzellen dar, wobei die Analyse aus den Fluoreszenzdaten mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode erfolgte. Als Referenzgen zur Normalisierung der Daten wurde β -Actin verwendet. Sternchen repräsentieren statistische Signifikanz in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle, die anhand einer One-Way Anova und Holm-Sidak Post-hoc Test ermittelt wurde (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Zwischen den mRNA-Expressionsraten von RFC und PCFT konnten untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Ein ähnliches Balkendiagramm ergab sich nach Inkubation der LS180-Zellen mit $1 \mu M$ B[a]P über 24, 72 oder 120 h (s. Abbildung 34). Allerdings fiel auf, dass für beide Folattransporter nach 72 h mit den relativen Transkriptmengen von $43,18\% \pm 10,95$ (RFC) und $46,70\% \pm 5,43$ (PCFT) im Vergleich zur Kontrolle fast die maximale Reduktion der Transkriptrate erreicht wurde und somit die Differenz zwischen den Ergebnissen nach 72 h und 120 h nur sehr gering ausgeprägt war. Diese betrug für RFC 6,86 % und für PCFT sogar nur 1,60 %. Obwohl die relativen Transkriptionsraten von RFC und PCFT nach 24 h bei B[a]P etwas niedriger lagen als nach Inkubation mit TCDD, ergab sich eine statistische Signifikanz für die Messdaten beider Folatcarrier nur zwischen den Kontrollzellen und den Inkubationszeiten 72 und 120 h.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation der Darmzelllinie LS180 mit AhR-Agonisten auch ein zeitabhängiger Einfluss auf die Genexpression von RFC und PCFT in diesem Versuchsansatz vorhanden ist. Dieser Effekt ist bei TCDD stärker ausgeprägt als bei B[a]P.

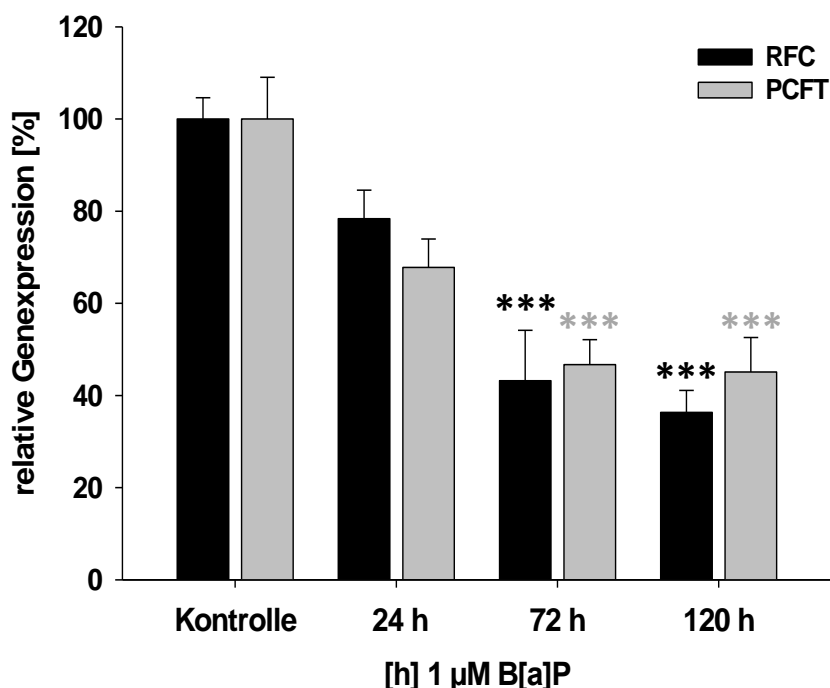


Abbildung 34: RFC- und PCFT-Genexpression in LS180-Zellen nach Inkubation mit B[a]P über 24 - 120 h

Abgebildet ist die relative Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen nach Inkubation mit 1 µM B[a]P über 24, 72 oder 120 h. Ermittelt wurde sie über eine TaqMan® qRT-PCR, wobei die Ergebnisse prozentual in Relation zu den unbehandelten Kontrollzellen (100 %) gesetzt wurden. Die Analyse erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode mit dem Referenzgen β -Actin. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 8 Einzelwerten. Signifikante Abweichungen von der unbehandelten Kontrolle wurden mittels One-Way Anova mit Holm-Sidak Post-hoc Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Zwischen den mRNA-Expressionsraten von RFC und PCFT konnten untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

4.3.2.3 Einfluss von TCDD und B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten

Abschließend wurden in den Genexpressionsanalysen die AhR-Antagonisten SAL und CH in Kombination mit TCDD und B[a]P eingesetzt, um zu untersuchen, ob die beobachtete Regulation der Genexpression von RFC und PCFT über den AhR-Signalweg erfolgt. Dafür wurden im ersten Versuchsansatz die LS180-Zellen zunächst für 2 h mit 500 µM SAL oder 10 µM CH inkubiert und anschließend jeweils 10 nM TCDD für 72 h hinzugegeben. Durch die Präinkubation mit SAL oder CH wird die Aktivierung des AhR durch TCDD unterbunden. Als Kontrollen dienten zum einen unbehandelte Zellen, sowie Zellen, die nur mit 10 nM TCDD über 72 h inkubiert wurden. In der statistischen Auswertung wurde ein Vergleich zwischen allen Vorbehandlungsansätzen des Experimentes durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Wirkung beider AhR-Antagonisten auf die Genexpression von RFC und PCFT entdecken zu können. Auch die mRNA-Expressionsmengen von RFC und PCFT in einem Versuchsansatz wurden untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft. Wie auch in den vorherigen Untersuchungen ergaben sich jedoch keine statistisch signifikanten Differenzen. Die statistischen Daten für die Genexpressionsanalysen unter Verwendung von AhR-Antagonisten sind separat in Tabelle A5 (Anhang II) aufgeführt.

In Abbildung 35 sind die relativen Genexpressionsmengen von RFC und PCFT aus diesem Versuch wiedergegeben. Die Ergebnisse der Kontrollen und der alleinigen Behandlung mit TCDD lagen im Bereich der vorangegangenen Versuche. Mit beiden AhR-Antagonisten konnte die Reduktion der durch TCDD verursachten Genexpression vollständig unterdrückt werden. Darüber hinaus führte die Präinkubation sowohl mit CH als auch mit SAL zu einer gesteigerten Genexpression beider Carrier über das Expressionsniveau der Kontrollzellen. So ergaben die Analysen für die Vorbehandlung mit SAL relative mRNA-Mengen von $124,49 \% \pm 10,3$ für den RFC und $129,32 \% \pm 11,91$ für den PCFT. In einem ähnlichen Bereich lagen die Genexpressionsdaten nach Vorbehandlung mit CH (RFC: $112,50 \% \pm 9,13$; PCFT: $134,08 \% \pm 9,66$). Statistisch signifikant verschieden zur Kontrolle waren diese Ergebnisse jedoch nicht (s. Tabelle A5, Anhang II). Allerdings ergaben sich statistisch signifikante Unterschiede für die Messdaten des RFC zwischen der alleinigen Inkubation mit TCDD und allen anderen Versuchsansätzen. Für den PCFT traf dies nur auf die alleinige Inkubation mit TCDD im Vergleich zu den Kontrollzellen und zur Inkubation mit CH in Kombination mit TCDD zu.

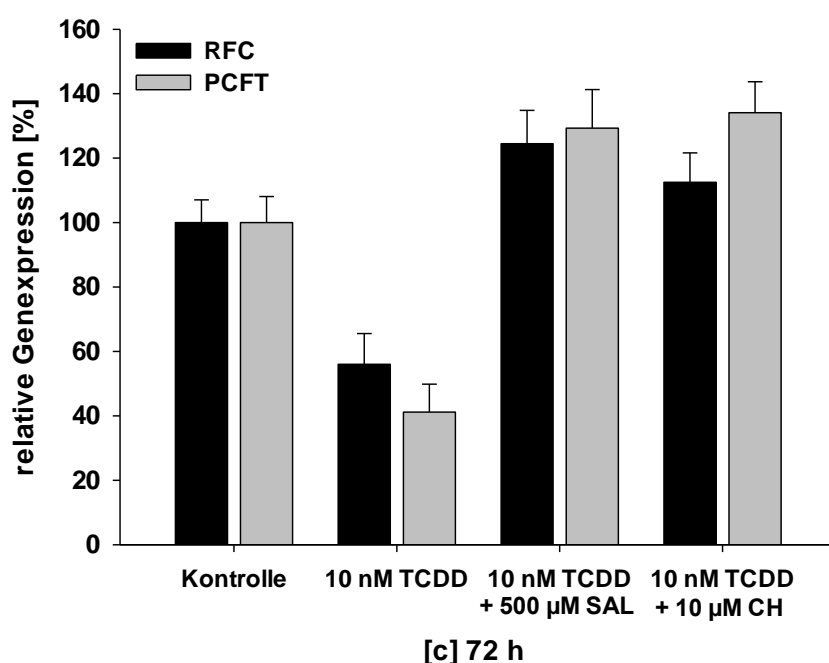


Abbildung 35: Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen nach Vorbehandlung mit TCDD in Kombination mit AhR-Antagonisten

Effekt von 10 nM TCDD in Kombination mit SAL oder CH auf die Genexpression von RFC und PCFT. Vor der RNA-Isolation wurden LS180-Zellen entweder zunächst 2 h mit 500 µM SAL oder 10 µM CH inkubiert und folgend 10 nM TCDD für 72 h hinzugegeben oder die Zellen wurden ausschließlich mit 10 nM TCDD für 72 h behandelt. Nach Umschreiben der isolierten RNA in cDNA (s. 3.2.2.2) wurden die relativen Transkriptmengen von RFC und PCFT durch eine TaqMan® qRT-PCR unter Verwendung von β -Actin als Referenzgen bestimmt. Die relativen mRNA-Transkriptionsraten der beiden Folattransporter werden prozentual im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgedrückt und als Mittelwert \pm SEM wiedergegeben ($n = 8$). Die statistischen Daten wurden mittels One-Way Anova und Holm-Sidak Post-hoc Test ermittelt und sind separat in Tabelle A5 (Anhang II) aufgeführt.

Der Versuch wurde in dieser Form auch mit 1 µM B[a]P durchgeführt (s. Abbildung 36). Bei der Analyse der Ergebnisse aus der TaqMan® qRT-PCR ergaben sich in der Kontrolle und bei der alleinigen B[a]P-Inkubation ähnliche Werte wie in den dosis- und zeitabhängigen Versuchen. Mit $122,60 \% \pm 14,4$ (RFC) und $138,30 \% \pm 7,5$ (PCFT) relativer Genexpression unterschieden sich die Ergebnisse der Zellen mit der SAL-Präinkubation

nur wenig von den Werten aus dem vorangegangenen Versuch mit TCDD. Im resultierenden Balkendiagramm dieses Experimentes fiel jedoch auf, dass die Transkriptmengen nach Präinkubation mit CH in diesem Versuch stark abwichen. Für den RFC ergab sich eine relative Genexpression von $78,77 \% \pm 6,5$ und für den PCFT von $64,73 \% \pm 5,3$. Statistisch signifikante Unterschiede waren in diesem Versuchsansatz zwischen den relativen RFC mRNA-Mengen der Zellen mit SAL und TCDD Vorbehandlung und allen anderen Versuchsansätzen zu finden sowie zwischen Kontrolle und $1 \mu\text{M}$ B[a]P. Beim PCFT war dies nur zwischen der Vorbehandlung mit SAL + B[a]P und der alleinigen B[a]P-Inkubation sowie zwischen der Vorbehandlung mit SAL + B[a]P und der Vorbehandlung mit CH + B[a]P der Fall. Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen die Schlussfolgerung ziehen, dass die beiden AhR-Antagonisten bis auf eine Ausnahme die Reduktion der Genexpression beider Folattransporter vollständig verhindern konnten und somit die Regulation dieses Effektes vermutlich über die AhR-Signalkaskade erfolgt.

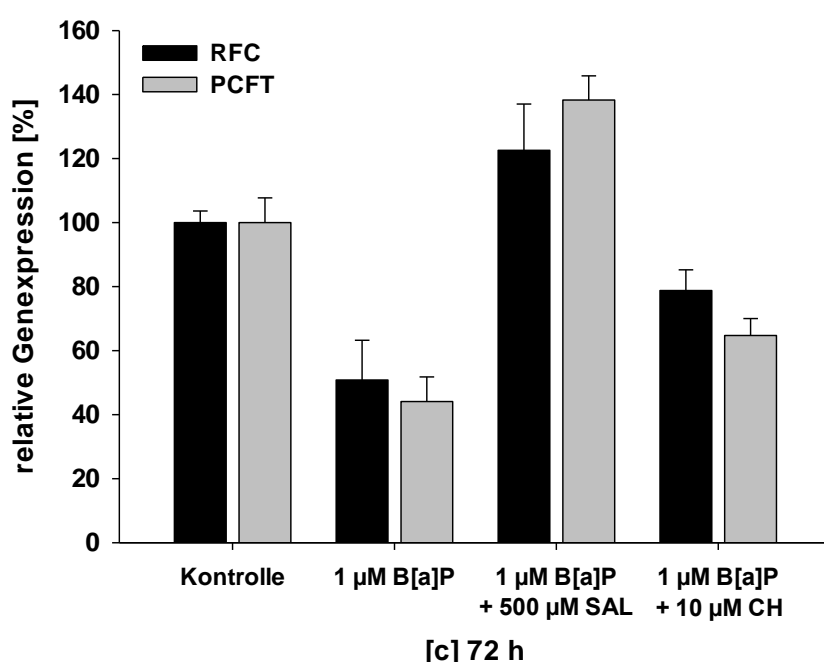


Abbildung 36: Einfluss von B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten auf die RFC- und PCFT-Genexpression in LS180-Zellen

LS180-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und über 72 h entweder ausschließlich mit $1 \mu\text{M}$ B[a]P behandelt oder es erfolgte zusätzlich eine Präinkubation (2 h) mit $500 \mu\text{M}$ SAL oder $10 \mu\text{M}$ CH. Nach Isolation der RNA wurden die Transkriptmengen von RFC und PCFT durch eine TaqMan® qRT-PCR in 96-Well PCR-Platten bestimmt, wobei zur Normalisierung der Daten die mRNA-Level des Housekeeping-Gens β -Actin verwendet und die Daten mittels $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Methode analysiert wurden. Im Diagramm dargestellt sind die relativen mRNA-Level ($\text{MW} \pm \text{SEM}$, $n = 8$) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle. Statistische Signifikanzen zwischen den Versuchsansätzen wurden über eine One-Way Anova mit Holm-Sidak Post-hoc Test ermittelt und sind in Tabelle A5 (Anhang II) wiedergegeben.

5 Diskussion

Der Folatmangel des Menschen ist bis heute insbesondere in Industrieländern ein weit verbreitetes gesundheitliches Problem (OAKLEY 2002). Zusätzlich zu einer verminderten Aufnahme können auch viele andere Faktoren wie Malabsorption, Stoffwechselstörungen oder Medikamentenwechselwirkungen eine Unterversorgung mit Folaten auslösen (ALLEN 2008). Da dieser Mikronährstoff für die Nukleinsäuresynthese essentiell ist, kann ein Mangel weitreichende gesundheitliche Folgen nach sich ziehen. Mammalia können dieses Vitamin nicht synthetisieren und müssen es über den Verdauungstrakt aufnehmen. In der Promoterregion der beiden spezifischen Transportproteine RFC und PCFT, die nach heutigem Kenntnisstand hauptsächlich für die Folataufnahme im Intestinaltrakt zuständig sind, konnten DREs nachgewiesen werden, die Bindungselemente für den nukleären Ah-Rezeptor darstellen. Dieser intrazelluläre Transkriptionsfaktor kann von zahlreichen Liganden aktiviert werden, unter denen sich auch ubiquitär vorkommende Umweltkontaminanten befinden. Die Regulation von Transportproteinen erfolgt nach heutigem Kenntnisstand vorwiegend auf Transkriptionsebene durch Regulation der Genexpression (XU et al. 2005) oder durch die schnelle und kurzfristige Phosphorylierung des jeweiligen Carrierproteins im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation (ROELOFSEN et al. 1998, NOE et al. 2001, WOLFF et al. 2003).

Um den möglichen Einfluss von AhR-Liganden auf den intestinalen Folattransport zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie die funktionelle Folataufnahme mittels Tritium-markierter Folsäure in einem humanen *in vitro* Modell charakterisiert und der Einfluss von Umweltkontaminanten vom Typ PAK und HAK untersucht. Notwendig war dafür zunächst die Charakterisierung der verwendeten LS180-Zellen als Modell für Transportvorgänge am Darm.

5.1 LS180-Zellen als Modell für Transportvorgänge am Darm

Für die Studien zu Aufnahmevorgängen am menschlichen Darm musste zunächst ein der *in vivo* Situation nahestehendes, passendes *in vitro* Zellkulturmodell ausgewählt werden. Die kontinuierlich wachsende immortale Zelllinie LS180 besaß die benötigten Eigenschaften für die Charakterisierung der Folsäureaufnahme wie die endogene Expression wichtiger Import- und Exportcarrier (s. u.). Der Ursprung dieser Zelllinie ist ein humanes Adenokarzinom des Kolon.

Obwohl der Großteil der Aufnahme an Nahrungsfolaten im Duodenum und Jejunum stattfindet (SAID und KUMAR 1999), kann man der wissenschaftlichen Literatur zunehmende Evidenz einer zusätzlichen Transportaktivität im Dickdarm entnehmen (SAID und MOHAMMED 2006). So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die im Kolon von Säugetieren befindlichen Bakterien der natürlichen Mikroflora in der Lage sind, signifikante Folatmengen herzustellen (DAFT et al. 1963, KLIPSTEIN und SAMLOFF 1966). Wahrscheinlich stehen diese dem Wirt auch zur Verfügung und werden zumindest anteilig aufgenommen (RONG et al. 1991, KIM et al. 2004). In diesem Zusammenhang gelang es AUFREITER et al. (2009), beim Menschen radioaktiv markiertes 5-MTHF nach ausschließlich caecaler Infusion im Blut nachzuweisen. Der funktionelle Aufnahmemechanismus im Dickdarm wurde 1997 von DUDEJA et al. (1997) in der isolierten apikalen Membran von humanen Kolonzellen charakterisiert. Er konnte keine Unterschiede

bezüglich der Transportcharakteristika im Vergleich zur Folataufnahme in Dünndarmzellen feststellen (SELHUB und ROSENBERG 1981, CHIAO et al. 1997). Eine Zuordnung der Aufnahme zu einem bestimmten Transporter war zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgt bzw. noch nicht möglich. Nach heutigem Kenntnisstand scheinen jedoch insbesondere die beiden Transportproteine RFC und PCFT an der aktiven intestinalen Folataufnahme beteiligt zu sein (CHIAO et al. 1997, BALAMURUGAN und SAID 2006, QIU et al. 2006, YUASA et al. 2009). Studien zur Expression der beiden Transporter im Intestinaltrakt erbrachten den Nachweis signifikanter mRNA-Mengen sowohl vom RFC als auch vom PCFT (QIU et al. 2006, YUASA et al. 2009). Allerdings waren die gemessenen Werte im Dickdarm etwas niedriger als im Dünndarm. Es ergab sich bei beiden Transportern im Intestinum von kranial nach kaudal ein kontinuierliches Absinken der mRNA-Level, so dass im Rektum nur noch wenig mRNA nachweisbar war (WHETSTINE et al. 2002a, SHAYEGHI et al. 2005, URQUHART et al. 2010).

Die einzige verfügbare und etablierte humane Dünndarmzelllinie HuTu-80 entstammt einem Adenokarzinom des Duodenums. NIESTROY (2009) konnte für diese Zelllinie keine Induktion der mRNA-Level von CYP1A1 und 1B1 durch B[a]P oder TCDD belegen, was im Gegensatz zur *in vivo* Situation im humanen Duodenum steht (BUCHTHAL et al. 1995, ZHANG et al. 1999). Gleichzeitig konnte in dieser Dissertation auch nur eine sehr niedrige Grundexpression des CYP1A1-Isoenzym auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Der CYP1A1-Proteinnachweis gelang weder in unbehandelten noch in B[a]P-induzierten HuTu-80-Zellen. Dementsprechend war es auch nicht möglich, in diesen Zellen eine EROD-Aktivität nachzuweisen, da diese hauptsächlich CYP1A1 vermittelt ist (s. 5.1.2). Zum einem ähnlichen Ergebnis kam LAMPEN et al. (1998), der sowohl in HuTu-80-Zellen als auch in IEC-6-Zellen, die dem Duodenum der Ratte entstammen, weder Gen- bzw. Proteinexpression noch eine enzymatische Aktivität der Isoenzyme CYP1A1, 1A2 und 1B1 beobachten konnte. Da somit die Funktionalität der AhR-Signalkaskade in der HuTu-80-Zelllinie nicht eindeutig geklärt ist, war eine Verwendung im Hinblick auf diese Studie nicht sinnvoll.

Für die Auswahl der Kolonzelllinie LS180 waren dann mehrere Gesichtspunkte ausschlaggebend. Zum einen wachsen die kultivierten Zellen als Monolayer und zeigen dabei eine epitheliale Morphologie. Auch eine Expression von zahlreichen Mikrovilli konnte nachgewiesen werden, was für eine Oberflächendifferenzierung der Zellen spricht (TOM et al. 1976, BRANDON et al. 2006). Des Weiteren wurde diese Zelllinie bereits für Aufnahme- und Regulationsstudien verwendet und entsprechend charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurde sie hauptsächlich für Untersuchungen zur Arzneimittelaufnahme eingesetzt (LI et al. 2003, COLLETT et al. 2004, FUKUMORI et al. 2009).

BRANDON et al. (2006) wies in seiner Studie die Eignung der LS180-Zellen als *in vitro* Darmmodell nach, indem er sie auf Polymorphismen in verschiedenen CYPs, Phase-II-Enzymen und ABC-Transportern untersuchte. Für die Carrier BCRP, MRP2 und MDR1 konnte er dabei eine relativ niedrige, aber induzierbare Expression zeigen. Es ließen sich vereinzelte Polymorphismen im Cytochrom P450-System nachweisen, die er jedoch als unbedeutend beurteilte. Das für diese Studie bedeutsame CYP1A1 scheint dabei in den LS180-Zellen in der Wildtypform vorzuliegen (BRANDON et al. 2006). Die Funktionalität und Induzierbarkeit des Cytochrom P450-Systems wurde unter anderem auch von KARYEKAR et al. (2002) und NETSCH et al. (2006) bestätigt. Voraussetzung dafür ist eine intakte AhR-Signalkaskade, die in den LS180-Zellen detailliert von HARPER et al. (1991) und LI et al. (1998) beschrieben wurde. Verschiedene andere Rezeptoren wie der Steroid and Xenobiotic Receptor (SXR) oder der Pregnane X Receptor (PXR) sind in den LS180-Zellen

existent und funktionell aktiv (ZHOU et al. 2004, GUPTA et al. 2008). Jedoch wurden bisher keine Aufnahmestudien mit Folaten oder ein Nachweis der verschiedenen Folattransporter durchgeführt. Letztendlich war für die folgenden Versuche auch entscheidend, dass sich die Zellen gut vereinzeln und in Suspension verbringen lassen, was bei der sehr häufig verwendeten und gut charakterisierten humanen Dickdarmzelllinie Caco-2 nicht möglich ist. Diese Eigenschaft war notwendig für die Durchführung von Aufnahmestudien, bei denen sich die Zellen in Suspension befanden. Trotz der oben erwähnten Studien mit den LS180-Zellen wurde vor Beginn der Versuche eine weiterführende Charakterisierung vorgenommen, um die später erhobenen Daten besser auswerten und interpretieren zu können.

5.1.1 Zytotoxizitätsstudien in den LS180-Zellen

Vor Beginn der Regulationsstudien wurden zunächst zytotoxische Effekte der potentiellen Modulatoren der Folatcarrier sowie der anderen eingesetzten Substanzen unter Verwendung des WST-1-Proliferationstests ausgeschlossen. Im Gegensatz zum häufig verwendeten Neutralrot-Test wird hier nicht der Anteil lebender zu toter Zellen bestimmt, sondern die Anzahl an metabolisch aktiven Zellen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle, da nur bei einer intakten Atmungskette das chromogene Tetrazoliumsalz zu dem dunkelroten, wasserunlöslichen Formazan reduziert werden kann. Dabei wurde in diesem Zusammenhang bei den potentiellen Modulatoren der Folatcarrier nur die Langzeittoxizität über 72 h bestimmt, da dies in den folgenden Versuchen die Standardinkubationszeit darstellte. In der Literatur existieren bisher kaum Daten zu Toxizitätsversuchen in LS180-Zellen.

Die drei Wirkstoffe TCDD, B[a]P und 3-MC zeigten in den WST-1-Toxizitätstests übereinstimmend eine Steigerung der Zellviabilität bei niedrigen Konzentrationen bis 10 nM (TCDD, 3-MC) bzw. 100 nM (B[a]P). Da alle 3 Substanzen Agonisten des AhR sind, beruht diese Stimulation der Zellproliferation möglicherweise auf einem c-Src-vermittelten Co-Stimulation des Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) durch eine Aktivierung des AhR (PONTILLO et al. 2011, XIE et al. 2012). Das Akronym c-Src steht dabei für eine intrazelluläre Tyrosinkinase, die zahlreiche zelluläre Signalmoleküle direkt oder indirekt aktiviert. Für PAK, zu denen B[a]P gehört, wird auch eine Beteiligung des Estrogenrezeptors vermutet, welcher die Zellproliferation stimulieren kann (SEGARS und DRIGGERS 2002, PLISKOVA et al. 2005). In einer aktuellen Studie, die in humanen MCF-7-Zellen (Brustkrebszellen) durchgeführt wurde, konnte dies auch für TCDD beschrieben werden (CHEN et al. 2012). Bei einer weiteren Steigerung der eingesetzten Konzentration ergab sich bei allen 3 Substanzen ein starker Abfall der Zellviabilität.

Der ermittelte IC_{50} -Wert für TCDD über 72 h lag bei 52,45 nM. Es ließen sich in der Literatur allerdings keine Vergleichswerte für intestinale Zellen finden. Jedoch konnte in einer vergleichenden Studie zur Sensitivität von HepG2-Zellen und Hepatozyten von Menschen, Rhesusaffen und Ratten bis zu einer Substanzkonzentration von 100 nM TCDD keinerlei Zelltoxizität mittels des MTT-Tests beobachtet werden (SILKWORTH et al. 2005). Auch ZEIGER et al. (2001) wies bis zu einer Konzentration von 100 nM TCDD über 48 h in HepG2,- sowie H4IIE-Zellen keine viabilitätsmindernden Effekte nach.

Für B[a]P lag der IC_{50} in LS180-Zellen bei 3,83 μ M. Im deutlichen Gegensatz dazu wurden in den Studien von NIESTROY (2009) und SUGIHARA et al. (2007) bis zu einer Substanzkonzentration von 50 μ M keine toxischen Reaktionen in Caco-2- und HuTu-80-Zellen beobachtet. Allerdings betrug die Inkubationszeit nur 48 h und die Viabilität wurde mittels Neutralrot-Test bestimmt. Eine Vergleichbarkeit dieses Testsystems

mit dem WST-1-Toxizitätstest ist nur bedingt gegeben. PLISKOVA et al. (2005) erfasste bei 1 μM B[a]P über 5 Tage ebenfalls keine zytotoxische Wirkung in MCF-7 Zellen. Im Kontrast beschrieb JEFFY et al. (2000) in der gleichen Zelllinie bei 1 μM B[a]P über 72 h eine Reduktion der Zellproliferation auf 30 % in Relation zur unbehandelten Kontrolle. Warum diese großen Differenzen der Zytotoxizität bei B[a]P auftraten ist unklar, aber wie bereits oben erwähnt lassen sie sich möglicherweise neben den verschiedenen Ursprungsgeweben der Zellen durch eine unterschiedliche Versuchsdurchführung bzw. die Verwendung verschiedener Toxizitätstests erklären.

Für 3-MC konnte in den LS180-Zellen ein IC_{50} -Wert von 62,95 nM bestimmt werden. In der gleichen Zelllinie arbeitete LI et al. (1998) mit 100 nM über maximal 72 h um die CYP1A2-Induktion zu untersuchen. Aussagen zur Zytotoxizität wurden in dieser Studie jedoch nicht getroffen. Ebenfalls konnte RIDDICK et al. (1994) in der murinen Hepa-1 Zelllinie mit 100 nM 3-MC über 96 h keine Zelltoxizität beobachten.

Da bei allen 3 Substanzen toxische Effekte bei niedrigeren Konzentrationen beobachtet werden konnten, als in der Literatur angegeben, scheinen die LS180-Zellen in dieser Hinsicht etwas sensibler zu sein als andere Darmzelllinien. Möglicherweise beruht dies auf der relativ hohen nachgewiesenen Aktivität der AhR-Signalkaskade in den LS180-Zellen (HARPER et al. 1991). Da die toxische Wirkung dieser Substanzen, die zu den HAK und PAK gehören, bekanntermaßen über den AhR vermittelt werden (ROWLANDS und GUSTAFSSON 1997, MACDONALD et al. 2004), könnte sich dadurch eine erhöhte Toxizität in den LS180-Zellen ergeben. Aber auch Unterschiede in den Zellkulturbedingungen können nicht ausgeschlossen werden. Für die folgenden Experimente fanden nur Substanzkonzentrationen Verwendung, bei denen im WST-1-Test keine toxischen Effekte in den LS180-Zellen nachweisbar waren.

Bei den Viabilitätsversuchen mit den beiden Antifolaten RTX und PMX ließ sich nur eine mäßige Toxizität in den LS180-Zellen beobachten. Nach Vorbehandlung mit diesen Substanzen kam es zu einem kontinuierlichen Absinken der metabolischen Aktivität mit steigender Konzentration, was sich anhand der Wirkungsweise von PMX und RTX erklären lässt. Als Folsäure-Analoga hemmen sie mehrere Enzyme der DNA- und RNA-Nukleotid-Synthese und haben bereits in geringen Konzentrationen eine zytostatische Wirkung (MATHERLY et al. 1987, TAKIMOTO 1996). Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie in Humanmedizin als Therapeutika für eine Vielzahl von Tumorformen eingesetzt (TAKIMOTO 1996, WANG et al. 2002).

Ein ähnlicher Effekt ergab sich mit dem AhR-Antagonisten und Salicylsäurederivat SAL, dass ebenso wie viele andere Salicylate antiphlogistische und analgetische Eigenschaften aufweist. So findet SAL auch in der Humanmedizin Verwendung, z. B. zur lokalen Behandlung von Zahnschmerzen. Über einen großen Konzentrationsbereich bis 500 μM führte diese Substanz in den LS180-Zellen kaum zu Veränderungen in der metabolischen Aktivität (s. 4.1.1.3). Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte MACDONALD et al. (2004) in HepG2-Zellen bis hin zu einer Konzentration von 1000 μM SAL keinen Einfluss auf die Viabilität beobachten. Der spezifische AhR-Antagonist CH zeigte im WST-1-Test ebenfalls nur eine sehr geringe Toxizität. Jedoch war nach einer Inkubation mit 10, 50 oder 100 μM CH ein signifikanter Anstieg der metabolischen Aktivität auf ca. 115 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten (s. Abbildung 27). Diesen proproliferativen, AhR-unabhängigen Effekt konnte bereits CHOI et al. (2012) an Hepa1,- und HepG2-Zellen im WST-1-Test nachweisen. In dieser Studie lagen die Messwerte nach einer

Inkubationszeit von 72 h und einer Konzentration von 100 μM im Bereich von 140 - 150 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die genaue Ursache dieses Effektes ist momentan noch unklar.

5.1.2 Funktionalität der AhR-Signalkaskade

Für den Nachweis der Funktionalität der AhR-Signalkaskade in diesem Zellmodell wurde die EROD-Aktivität gemessen. Dieser Test ist eine häufig verwendete Methode um die metabolische Aktivität der Cytochrom P450-Isoenzyme 1A1, 1A2 und 1B1 *in vitro* zu bestimmen (COOK et al. 1987, ZEIGER et al. 2001). Diese Isoenzyme können über die AhR-Signalkaskade insbesondere durch verschiedene HAK und PAK sowie strukturell verwandte Stoffklassen aktiviert werden (BUCHELI und FENT 1995, WHYTE et al. 2000, PETRULIS et al. 2001). Dabei konnten Studien zeigen, dass die EROD-Enzymaktivität zum großen Teil die CYP1A1- (ca. 80 %) und nur mit deutlich geringeren Anteilen die CYP 1B1 und CYP 1A2-Aktivität widerspiegelt (CHUN et al. 2001, CHEN et al. 2010a). Weiterführend kann der EROD-Assay verwendet werden, um die Potenz eines AhR-Agonisten *in vitro* zu bestimmen (ZEIGER et al. 2001). Allerdings ist CYP1A1 *in vivo* nicht das dominierende Cytochrom P450 Isoenzym im Gastrointestinaltrakt. So wurde es in verschiedenen Studien zwar immer auf mRNA-, aber nur selten auf Proteinebene nachgewiesen (ZHANG et al. 1999), im Gegensatz zu den am stärksten exprimierten Isoenzymen CYP3A5 und CYP2J2 sowie im Dünndarm CYP3A4 (NISHIMURA et al. 2003, BIÈCHE et al. 2007). Nach Induktion, z. B. mit TCDD, war ein Nachweis von CYP1A1 *in vivo* jedoch immer möglich (ROSENBERG 1991, BUCHTHAL et al. 1995).

Im Hinblick auf die in dieser Studie untersuchten Isoenzyme stellen die LS180-Zellen ein gutes Modell der *in vivo*-Situation dar. Laut einer Studie von IWANARI et al. (2002) scheint die mRNA von CYP1A1, CYP1B1 und CYP1A2 in den LS180-Zellen konstant exprimiert zu werden, wobei jedoch die CYP1A2-Level auf einem deutlich geringeren Niveau lagen als die Level von CYP1A1 und CYP1B1. LI et al. (1998) dagegen konnte in unbehandelten LS180-Zellen mittels RT-PCR kein Signal für die mRNA von CYP1A1 und CYP1A2 detektieren, aber für CYP1B1. Übereinstimmend wurden in beiden Studien alle drei Isoenzyme auf mRNA-Ebene durch TCDD, B[a]P und 3-MC deutlich induziert (IWANARI et al. 2002, LI et al. 1998). In der vom selben Spender abstammenden LS174T-Zelllinie wurde mittels EROD eine geringe Grundaktivität von CYP1A1 und CYP1A2 sowie eine Induktion durch Benzo[a]anthracen beobachtet (WHITE et al. 1991). Die Messwerte waren vergleichbar mit der Induktion in Primärzellen (HAMMOND und STROBEL 1992). BRANDON et al. (2006) konnte zudem in seiner Untersuchung zur Existenz von Polymorphismen in verschiedenen CYPs sowie Phase-II-Enzymen zeigen, dass CYP1A1 in den LS180-Zellen in der Wildtypform vorliegt. Bezüglich des AhR wies HARPER et al. (1991) ein funktionelles, stabiles System unter Verwendung der auch in dieser Studie eingesetzten Induktoren nach. Vergleichbare Daten zur EROD-Aktivität in der LS180-Zelllinie standen jedoch nicht zur Verfügung.

In Rahmen dieser Studie konnte in den unbehandelten LS180-Zellen nur eine geringe Grundaktivität im EROD-Assay beobachtet werden. Folgend einer Inkubation mit dem stärksten bekannten AhR-Liganden TCDD ergab sich dann wie erwartet eine deutliche zeit- und dosisabhängige Induktion der Enzymaktivität. Im untersuchten Dosisbereich von 0,01 bis 10 nM stieg die Aktivität kontinuierlich und sehr stark bis auf ein Maximum von 285 ± 19 pmol/mg Protein/min bei einem Einsatz von 10 nM TCDD an. In einer ähnlichen Studie, in der mit Caco-2-Zellen gearbeitet wurde, beschrieb POHL et al. (2006) nach 48 h mit 1 nM TCDD

eine relative Resorufinbildung von 223 ± 35 pmol/mg Protein/min im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. ZEIGER et al. (2001) wies nach 48 h mit 1 nM TCDD in HepG2-Zellen einen Messwert von ca. 80 pmol/mg Protein/min relativer Resorufinbildung nach, während der Messwert in den LS180-Zellen bei ca. 25 pmol/mg Protein/min lag. Jedoch existiert in der Leber als Organ für die primäre Entgiftung eine deutlich höhere CYP1A1-Expression als im Intestinaltrakt (NISHIMURA et al. 2003, BIÈCHE et al. 2007). In den zeitabhängigen Versuchen mit 1 nM TCDD stellte sich nach einer Behandlungszeit der Zellen von 12 h ein signifikanter initialer Anstieg der EROD-Aktivität auf $39,8 \pm 13,3$ pmol/mg Protein/min dar. Mit steigender Inkubationsdauer ließ sich eine weitere deutliche Zunahme der EROD-Aktivität in den LS180-Zellen nach 72 h ($88,8 \pm 13,7$ pmol/mg Protein/min) und nochmals nach 96 h ($227,2 \pm 46,5$ pmol/mg Protein/min) beobachten. Ursache für diese fortgesetzte EROD-Aktivität ist die hohe Persistenz von TCDD (DEVITO und BIRNBAUM 2003). So kann es in Säugerzellen nur sehr schlecht bis gar nicht metabolisiert werden, was in einer langen Halbwertszeit resultiert (VINOPAL und CASIDA 1973, ROSE et al. 1976). Dadurch kommt es in der Zelle zu einer stetigen AhR-Induktion (RIDDICK et al. 1994). So konnte in einer *in vivo* Studie von POLAND und GLOVER (1974), die in Ratten durchgeführt wurde, nach einer einmaligen Gabe von 31,1 nmol/kg TCDD nach 35 Tagen immer noch eine deutlich erhöhte CYP1A1-Aktivität in der Leber nachgewiesen werden.

Im Kontrast zu diesen Ergebnissen fiel die EROD-Aktivität in den LS180-Zellen nach einer Inkubation mit 0,1 μ M B[a]P folgend einem initialen Anstieg nach 12 h auf $218,1 \pm 12,1$ pmol/mg Protein/min sehr schnell ab, so dass sie nach 96 h kaum noch nachweisbar war (s. Abbildung 9). Die Ursache für das schnelle Absinken der CYP-Induktion nach Vorbehandlung mit B[a]P liegt hauptsächlich in der raschen zellulären Metabolisierung von B[a]P begründet (BAUER et al. 1995, XU et al. 2005). Denn neben den CYPs werden durch PAK auch verschiedene Phase-II-Enzyme induziert, die den Stoffwechsel beschleunigen (XU et al. 2005). Insbesondere wenn CYP1A1 bereits induziert ist, erfolgt die Umwandlung zu den für die AhR-Induktion unwirksamen B[a]P-Metaboliten innerhalb von wenigen Stunden (JIANG et al. 2007). ROOS et al. (2004) beschrieb in diesem Zusammenhang allerdings deutliche spezies- und gewebsspezifische Unterschiede. Zusätzlich hat B[a]P wahrscheinlich eine deutlich niedrigere Affinität zum Ah-Rezeptor als TCDD, was HARPER et al. (1991) in seiner Studie in LS180-Zellen mit einer deutlichen Verschiebung des EC_{50} -Werte für die AhR-Induktion von TCDD (4×10^{-10} M) hin zu B[a]P ($1,5 \times 10^{-5}$ M) zeigen konnte. Zu bedenken ist auch, dass mit dem AHRR auch noch ein negativer Rückkopplungsmechanismus des AhR existiert.

Des Weiteren wurde auch mit dem ebenfalls zu den PAK zugehörigen 3-MC gearbeitet. Bei dieser Substanz ergab sich im EROD-Assay ein B[a]P-ähnliches zeit- und dosisabhängiges Profil. Allerdings ließ sich mit 3-MC nur eine geringe Induktion der EROD-Aktivität beobachten, was sich in ca. nur 1/5 der Höhe der Messwerte im Vergleich zu einer Induktion mit B[a]P niederschlug. In der Literatur wurde bereits in Hepa-1 Zellen von einer ungefähr 1000-fach niedrigeren Potenz des 3-MC in Relation zu TCDD bezüglich der Induktion des CYP1A1 berichtet (RIDDICK et al. 1994). Allerdings beschreibt der Autor keine geringere Affinität des 3-MC zum Ah-Rezeptor. Er vermutet als Hauptursache für die unterschiedliche Potenz die rasche metabolische Inaktivierung des 3-MC im Vergleich zum schlecht verstoffwechselbaren TCDD. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte auch die Regulation der Cytochrome in LS180-Zellen durch TCDD und 3-MC. Der EC_{50} -Wert für die CYP1A1 mRNA-Induktion lag in diesem Versuch bei 1,8 μ M nach 20 h Inkubationszeit (LI et al. 1998). Aufgrund der Ergebnisse im EROD-Assay wurde 3-MC für die folgenden Regulationsstudien nicht mehr eingesetzt.

Zusammenfassend haben diese Untersuchungen unter Verwendung des EROD-Assays eindeutig die Funktionalität der AhR-Signalkaskade und damit die Eignung der LS180-Zellen als humanes *in vitro* Modell für die mögliche Regulation der intestinalen Folataufnahme durch Cytochrom P450-Induktoren bestätigt.

5.1.3 Nachweis der Import- und Exportcarrier für Folate

Für die in Bezug auf die Fragestellung dieser Dissertation abschließende Charakterisierung der LS180-Zellen wurde die Expression der in den Folattransport involvierten Import- und Exportcarrier mittels RT-PCR und Western Blot untersucht.

So gelang in der konventionellen RT-PCR der spezifische Nachweis der drei Folatimportcarrier RFC, PCFT und FOLR1 auf mRNA-Ebene (s. Abbildung 11, (B)). Die RT-PCR wurde mit verschiedenen Passagen der LS180-Zellen durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Importcarrier konstant in der Zelllinie exprimiert werden. Für die nach aktuellem Kenntnisstand in den Folatexport involvierten Carrier der ABC-Superfamilie MRP1 - 6, MDR1 und BCRP konnten ebenfalls in den Positivkontrollen spezifische Banden nachgewiesen werden (s. Abbildung 12, A). Bei dem Transporter MRP3 ergaben sich auf dem Agarosegel zwei klar voneinander abgegrenzte Banden (328 bp bzw. 477 bp). Sie ließen sich zwei unterschiedlichen Transkriptvarianten zuordnen (Accession No. NCBI: AF085691.1/AF009670.1), die von FROMM et al. (1999) und KOOL et al. (1999) publiziert wurden. Als interne Kontrolle für die RT-PCR wurde das Housekeeping-Gen β -Actin (ACTB) verwendet, welches konstitutiv exprimiert wird. In Bezug auf β -Actin ließ sich immer ein spezifisches PCR-Fragment mit einer Größe von 421 bp darstellen (s. Abbildung 11, (B) und Abbildung 13, (B)). Eine Kontamination z. B. durch genomische DNA konnte mittels Negativkontrollen (-RT-Kontrolle) jeweils eindeutig ausgeschlossen werden (s. Abbildung 11, (A) und Abbildung 13, (A)).

Eine Expression auf mRNA-Ebene bedeutet nicht zwangsläufig, dass auch eine Proteinexpression in Zellen stattfindet (LEWIS et al. 2003). Aufgrund dessen wurden die beiden Importcarrier RFC und PCFT, die nach heutigem Kenntnisstand für die intestinale Folataufnahme bei Säugetieren verantwortlich sind, in den LS180-Zellen auch auf Proteinebene untersucht, da dies für die Fragestellung dieser Arbeit von Bedeutung war. Das Molekulargewicht des RFC beträgt ~ 65 kDa. In der Western Blot-Analyse ergab sich jedoch eine deutliche Bande bei ~ 54 kDa sowie darunter zusätzlich einige deutlich schwächere Banden (s. Abbildung 13, Mitte). Diese blieben auch bei verändertem Versuchsprotokoll unter Verwendung von reduzierenden/nicht reduzierenden Bedingungen erhalten. Um Aussage zur Spezifität der Banden treffen zu können, wurde zusätzlich eine Untersuchung mit einem Rfc1-Blocking Peptid („peptide competition assay“) durchgeführt (HINKEN et al. 2011). Da der Primärantikörper durch das Blocking Peptid gebunden wird, ist eine spezifische Bindung an das Epitop im Protein des Western Blots nicht mehr möglich. Unter Verwendung des Rfc1-Blocking Peptids waren keine Banden auf dem Blot sichtbar. Somit ist eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers unwahrscheinlich. Möglicherweise kam es teilweise zu einem Abbau durch Proteasen, die zu kleineren Bruchstücken des Proteins führen können. Die Mehrfachbanden könnten auch durch die Bildung von verkürzten Proteinen entstanden sein, verursacht z. B. durch eine Gen-Mutation oder alternatives bzw. fehlerhaftes Spleißen. Eine posttranslationale Modifikation durch eine Glykosylierung wurde für das Protein des RFC ebenfalls beschrieben (WONG et al. 1998). Da das Protein dann aber mit einer durchschnittlichen Größe von ~ 85 kDa vorliegt, scheidet dies als Ursache für die Mehrfachbanden aus. Bezüglich des PCFT-Proteins ließen sich zwar recht schwache, aber spezifische

Banden bei ~ 50 kDa nachweisen, jedoch stellte sich eine relativ hohe Hintergrundfärbung als problematisch dar (s. Abbildung 13, rechts). Angepasste Reaktionsbedingungen sowie veränderte Konzentrationen der eingesetzten Antikörper erbrachten keine Unterschiede. Als Kontrolle wurde wiederum das Housekeeping-Gen β -Actin verwendet. Es ließ sich für β -Actin eine spezifische Bande mit der korrekten Molekülmasse von ~ 47 kDa im Western Blot nachweisen (s. Abbildung 13, links).

Mittels der RT-PCR und des Western Blots konnte gezeigt werden, dass die LS180-Zellen die untersuchten Import- und Exportcarrier auf mRNA-Ebene und RFC sowie PCFT auch auf Proteinebene exprimieren. Die LS180-Zellen stellen somit ein geeignetes *in vitro* Modell für die Untersuchung der aktiven RFC- bzw. PCFT-vermittelten intestinalen Folsäureaufnahme dar.

5.2 Funktionelle Untersuchungen zur Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure in LS180-Zellen

5.2.1 Funktionelle Charakterisierung der $^3\text{[H]}$ -Folsäureaufnahme in LS180-Zellen

Folate spielen eine entscheidende Rolle im Zellstoffwechsel, da sie als Überträger von C1-Fragmenten verschiedener Oxidationsstufen direkt an der Nukleinsäuresynthese beteiligt sind. Jedoch können Mammalia Folate nicht selber synthetisieren, so dass spezifische Transportsysteme existieren müssen, um die Folataufnahme aus externen Quellen über den Verdauungstrakt zu realisieren. Dabei wird die aktuelle intrazelluläre Folatkonzentration durch eine Vielzahl an Prozessen bestimmt, die einer koordinierten und komplexen Regulation unterliegt (SAID et al. 1997, SAID et al. 2000, LIU et al. 2005, ASHOKKUMAR et al. 2007, PAYTON et al. 2007, SUBRAMANIAN et al. 2008). Die Aufklärung dieser Regulation ist daher prinzipiell nur in einem der *in vivo* Situation nahestehendem *in vitro* Zellkulturmodell möglich.

Ziel dieser Studie war zunächst die Charakterisierung der intestinalen Folataufnahme in LS180-Zellmodell über funktionelle Transportversuche. Bislang vorliegende Transportstudien an humanen Darmzellen oder auch an Darmzellen von Nagetieren fanden vorrangig mit dem Zytostatikum und Antifolat MTX statt (GOLDMAN et al. 1968, HENDERSON und ZEVELY 1984, SIERRA et al. 1997, WANG et al. 2004), vor allem aufgrund seiner langsamen Metabolisierung sowie seiner gut untersuchten Bindungseigenschaften (GOLDMAN et al. 1968). Jedoch unterscheidet sich MTX insbesondere hinsichtlich der Affinität zu den Transportproteinen (RFC, PCFT, FR α) von den physiologischen Nahrungsfolaten, die zum großen Teil aus Polyglutamaten bestehen (SIROTNAK und TOLNER 1999, MATHERLY und GOLDMAN 2003, WANG et al. 2004). Während die Absorption der Monoglutamate nahezu vollständig erfolgt, sind die PteGlu₂₋₈ in der Regel deutlich schlechter resorbierbar, da sie zunächst enzymatisch durch eine primär im Bürstensaum jejunaler Mukosazellen lokalisierte zinkabhängige γ -Glutamat-Carboxypeptidase II zu Monoglutamatverbindungen hydrolysiert werden müssen (CHANDLER et al. 1986). Folsäure als Monoglutamat stellt unter den Folaten die stabilste Form des Vitamins dar. Zudem konnten BHANDARI und GREGORY (1992) zeigen, dass oral verabreichte Folsäure sowie deren biologisch aktive Derivate 5-MTHF und 5-FTHF, die ebenfalls zu den Monoglutamaten gehören, eine vergleichbare Bioverfügbarkeit aufweisen, so dass als Substrat in dieser Studie Tritium-markierte Folsäure zum Einsatz kam.

Des Weiteren wurden in den publizierten Studien hauptsächlich Caco-2-Zellen verwendet, eine humane Kolonkarzinomzelllinie, bei der nur eine Messung am intakten Monolayer durchgeführt werden kann. Dies ermöglicht in Aufnahmestudien mit radioaktiv markiertem Substrat nur einen einzigen Messwert in einem Versuchsansatz, was insbesondere das Verständnis der zeitabhängigen Aufnahmen und Kinetiken schwierig macht. Die LS180-Zellen erlauben hingegen auch die Durchführung von Transportstudien, bei denen sich die Zellen vereinzelt in einer Suspension befinden. Diese Eigenschaft hat den Vorteil, dass bei einer Aufnahme zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen und aus diesen Messwerten nichtlineare Regressionskurven erstellt werden können. Zur Beurteilung der Folsäureaufnahme ist vor allem die Aufnahmegeschwindigkeit innerhalb der initialen Aufnahmephase entscheidend, da das intrazelluläre Folsäuregleichgewicht möglicherweise durch Faktoren wie die Elimination durch verschiedene Exportcarrier beeinflusst wird, so dass zunächst die Zeitdauer bis zum Eintritt eines stabilen intrazellulären Folsäuregleichgewichtes in den LS180-Zellen bestimmt wurde. Da dieses Plateau in den LS180-Zellen bereits nach 3 min erreicht wird (s. Abbildung 14), wurde in den folgenden Versuchen die initiale Folsäureaufnahme mit 7 Messpunkten über einen Zeitraum von 2,5 min ermittelt.

Für die Aufnahmestudien wurde ein pH-Wert von 5.5 gewählt, denn obwohl im Dickdarm lumen ein etwas höherer pH-Wert herrscht, der sich ungefähr zwischen 6.0 und 6.8 bewegt und großen Schwankungen unterliegt, konnte für die direkte Umgebung an den Epithelzellen des Darmes ein azidotischer pH-Wert von ca. 5.5 - 6 nachgewiesen werden (SHIAU et al. 1985, SAID et al. 1986, MCEWAN et al. 1990, IKUMA et al. 1996). Die Aufnahme der Folsäure bei pH-Wert 5.5 wird, unabhängig von welchen Zellen oder Geweben, übereinstimmend als natriumunabhängig beschrieben (SAID et al. 1997, RAJGOPAL et al. 2001, MATHERLY und GOLDMAN 2003). Für die Messung in Suspension wurde Krebs-Ringer-Puffer verwendet (s. 3.1.2), der in geringgradig variierender Zusammensetzung bereits in zahlreichen Aufnahmestudien eingesetzt wurde (BOWMAN et al. 1986, HALWACHS et al. 2007, LEMOS et al. 2007).

Der $^3\text{[H]}$ -Folsäuretransport stellte sich übereinstimmend mit publizierten Daten zur intestinalen Folataufnahme in dem hier verwendeten Versuchsansatz als aktiver, sättigbarer Prozess dar, wobei in den unbehandelten Zellen ca. eine Verdreifachung der intrazellulären Radioaktivität über einen Zeitraum von 2,5 min beobachtet werden konnte (ZIMMERMAN 1990, SAID et al. 1997, BALAMURUGAN und SAID 2006). Die nichtlinearen Regressionskurven unterschieden sich bei den eingesetzten Folatkonzentrationen von 0,1 - 50 μM im Heiß-Kalt-Gemisch nur geringfügig (s. Abbildung 14). Als Ausgangspunkt für die Regressionskurve wurde der Messwert bei $t = 15\text{ s}$ verwendet, wobei die zu diesem Messzeitpunkt ermittelte Radioaktivität wahrscheinlich auf eine unspezifische Membranbindung zurückzuführen ist.

Es konnte für die $^3\text{[H]}$ -Folsäureaufnahme in den LS180-Zellen ein K_m -Wert von 27,91 μM sowie ein V_{\max} -Wert von 281,2 pmol/min berechnet werden (s. 4.2.1.2). Damit differieren diese Ergebnisse zum Teil deutlich von bereits publizierten Daten. KUMAR et al. (1997) ermittelte in der humanen Kolonzelllinie NCM460 für diesen Transport einen K_m -Wert von 1,4 μM . Im Gegensatz dazu wird für die humane Kolonzelllinie Caco-2 eine Konzentration von 134 μM als K_m -Wert für Folsäure angegeben (TAVARES et al. 2010). Wenn die Zellen in folatararmen Medium kultiviert wurden, stieg dieser sogar auf 159 μM . Eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse gab es mit den Daten von ZIMMERMAN (1990). Er bestimmte in humaner intestinaler Mucosa (Biopsien) einen K_m -Wert für die Folsäureaufnahme von 15,76 μM . Die V_{\max} -Werte differieren in den verschiedenen Studien ebenfalls im selben Umfang. Die genauen Ursachen für diese großen Differenzen sind unklar. Allerdings sind K_m und V_{\max} spezifische Eigenschaften der jeweiligen

Carrier. Da an der intestinalen Folataufnahme die Transportproteine RFC und PCFT beteiligt sind, beruhen die unterschiedlichen Ergebnisse möglicherweise auf einem unterschiedlichen Anteil der Carrier am aktiven Transportprozess im jeweiligen System. Der RFC besitzt eine hohe Affinität für reduzierte Folate, aber im Gegensatz zum PCFT eine niedrige Affinität für Folsäure (s. 5.2.2). Dafür sprechen die Ergebnisse von QIU et al. (2006), der für den PCFT in RFC deletierten Hela-R5-Zellen für Folsäure einen K_m -Wert von $1,3 \mu\text{M}$ berichten konnte.

Da bei 4°C ein aktiver Transport in die Zellen nur eingeschränkt stattfinden kann (TSUJI et al. 1994), wurde über die minimale Folataufnahme in diesem Versuch übereinstimmend mit den Daten von GOLDMAN et al. (1968) und SAID und STRUM (1983) gezeigt, dass die funktionelle Transportaktivität in den LS180-Zellen energieabhängig ist und zum großen Teil auf einem aktiven Transportvorgang beruht (s. Abbildung 17). Die gemessene zellassoziierte Radioaktivität ist wahrscheinlich einer unspezifischen Bindung von ^3H -Folsäure an die Zellmembran zuzurechnen, möglicherweise unter Beteiligung einer passiven Diffusion. SUBRAMANIAN et al. (2008) beobachtete in kultivierten Caco-2-Zellen große Unterschiede in der funktionellen Folataufnahme je nach Konfluenz des Monolayers. Dabei stieg die Transportaktivität mit zunehmender Differenzierung der Zellen deutlich an. Diese funktionelle Zunahme spiegelte sich auch in gesteigerten mRNA- und Proteinmengen von RFC und PCFT wieder. Im Gegensatz dazu konnten in dieser Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede in der funktionellen Transportaktivität zwischen den verschiedenen Konfluenzgraden des Monolayers festgestellt werden (s. Abbildung 16 in 4.2.1.3).

5.2.2 Differenzierung zwischen den beteiligten Transportproteinen an der ^3H -Folsäureaufnahme

Wie oben bereits erwähnt sind an der intestinalen Folataufnahme verschiedene spezifische Transportproteine wie die Importcarrier RFC und PCFT beteiligt. Der ubiquitär exprimierte RFC wurde lange Zeit als der wichtigste Folattransporter für diese Aufgabe angesehen (CHIAO et al. 1997, KUMAR et al. 1998, DUDEJA et al. 2001, BALAMURUGAN und SAID 2006, MATHERLY et al. 2007). Er konnte in allen Darmabschnitten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (SAID et al. 1996, NGUYEN et al. 1997, DUDEJA et al. 2001, WHETSTONE et al. 2002a). Darüber hinaus wurde in Mäusen und Ratten nach Gabe einer folatarmen Diät eine Zunahme der mRNA- sowie Proteinexpression des RFC im Dünndarm gezeigt (SAID et al. 2000, LIU et al. 2005, WANI et al. 2012).

Obgleich seiner Expression in intestinalen Epithelzellen sind einige Autoren der Meinung, dass er in Bezug auf die Aufnahme von Folaten aus dem Darm nur von untergeordneter Bedeutung ist. Seit seiner Entdeckung im Jahr 2006 durch QIU et al. (2006) wird eher dem PCFT die größere Bedeutung bezüglich der intestinalen Folatresorption zugeschrieben. Nach dem aktuellen Stand der Literatur wird sogar zum überwiegenden Teil davon ausgegangen, dass diese Aufnahme ausschließlich über den PCFT realisiert wird (ZHAO et al. 2010b, DESMOULIN et al. 2012). Grundsätzlich wurde in den Studien aber hauptsächlich entweder mit RFC bzw. PCFT-exprimierenden *Xenopus* Oozyten oder mit Zellen gearbeitet, in denen nach RNA-Silencing oder Mutation nur noch einer der beiden Folattransporter aktiv war (WANG et al. 2004, QIU et al. 2006, ZHAO et al. 2008). Dies spiegelt nicht die *in vivo* Situation inklusive der komplexen Regulationsmechanismen wieder.

Die beiden Hauptimportcarrier RFC und PCFT unterscheiden sich auch in ihrem pH-Optimum. Der verwendete saure pH-Wert, welcher den *in vivo* Verhältnissen angepasst ist, entspricht dabei im Wesentlichen dem pH-Optimum des PCFT. Jedoch scheint auch bei azidotischem pH-Wert eine Folataufnahme durch den RFC möglich zu sein. NABOKINA et al. (2004) konnte beispielsweise im Pankreas eine höhere Folatresorption bei niedrigem pH-Wert im Verhältnis zum neutralen pH-Wert zeigen, wobei die Transportaktivität bei beiden pH-Werten nach Silencing des RFC einen deutliche Minderung aufwies. Auch BALAMURUGAN und SAID (2006) verzeichneten in IEC-6 Zellen nach Silencing des RFC eine deutliche Verminderung der $^3\text{[H]}$ -Folsäureaufnahme um ca. 90 % bei pH 5.5. Dies spricht für einen Folattransport durch den RFC und den PCFT bei einem pH-Wert von 5.5.

Mit dem Folatrezeptor α (FR α) existiert neben den beiden genannten Carrierproteinen noch ein weiterer Transporter, welcher Folate über einen Endozytosevorgang aufnimmt (CHEN et al. 2013). Dabei besitzt er eine sehr hohe Affinität für Folsäure (ANTONY 1992). In intestinalen Zellen wird er jedoch nicht oder nur in sehr geringen Maß exprimiert, so dass er für die Aufnahme von Folaten über den Darm nur von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint (WEITMAN et al. 1992, WANG et al. 2005). Da er zusätzlich aufgrund seiner Funktionsweise deutlich langsamer als die anderen Transporter arbeitet, kann bei einer Messung der initialen Folsäureaufnahme eine Beteiligung des FR α größtenteils ausgeschlossen werden.

Einige *in vivo* Studien belegen, dass Folate neben den aktiven und sättigbaren Transportmechanismen auch zu einem geringen Prozentsatz mittels passiver Diffusion in die Zellen aufgenommen werden kann (GOLDMAN 1971, BLAIR et al. 1975, SAID und STRUM 1983, ZIMMERMAN 1990, ZHAO et al. 2009). Dabei scheint die passive Diffusion zwar auch bei niedrigen Substratkonzentrationen aufzutreten, aber erst bei höheren Konzentrationen von größerer Bedeutung zu sein (SAID und STRUM 1983, ZHAO et al. 2009). Im Rahmen der hier gewählten Versuchsbedingungen spielt jedoch der Anteil der passiven, intestinalen Folataufnahme höchstwahrscheinlich nur eine untergeordnete, vernachlässigbare Rolle.

Einfluss auf den aktuellen intrazellulären Folatspiegel hat auch eine Vielzahl von Effluxcarriern (HOOIJBERG et al. 2004, ASSARAF 2006). Für Mitglieder der „ATP-Binding Cassette“ (ABC)-Superfamilie inklusive der Multidrug Resistance-associated Proteins (MRPs/ABCC), insbesondere dem MRP1, sowie dem Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) konnte eine ATP-abhängige Transportaktivität mit geringer Affinität, aber hoher Kapazität nachgewiesen werden (ASSARAF 2006). Aber auch das Multidrug Resistance Protein 1 (MDR1/ABCB1) scheint am Folatefflux beteiligt zu sein (MATHERLY und GOLDMAN 2003, HOOIJBERG et al. 2006). Für einen Teil dieser Transporter wurden bereits Untersuchungen zur Kinetik des Folsäuretransportes durchgeführt (MRP3: $K_m = 1,96 \pm 0,05 \text{ mM}$, $V_{\max} = 1,71 \pm 0,05 \text{ pmol/mg/min}$ (ZENG et al. 2001); MRP4: $K_m = 0,17 \pm 0,02 \text{ mM}$, $V_{\max} = 0,68 \pm 0,14 \text{ pmol/mg/min}$ (CHEN et al. 2002); MRP5: $K_m = 1,0 \pm 0,1 \text{ mM}$, $V_{\max} = 875 \pm 75 \text{ pmol/mg/min}$ (WIELINGA et al. 2005)). ZIMMERMANN et al. (2005) untersuchte die Expression von MRP1 - 5 und MDR1 mittels qRT-PCR in Gewebeproben entlang des humanen Intestinaltraktes. Es gelang ihm im Kolon alle Transporter nachweisen, mit der stärksten Expression für den MRP3 und den MDR1 und der geringsten für den MRP2. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie, bei der in RT-PCR ebenfalls MRP1 - 5 und MDR1 sowie zusätzlich MRP6 und BCRP auf mRNA-Ebene nachweisbar waren (s. Abbildung 12). Allerdings ist mit der Methode der RT-PCR nur eine semiquantitative Analyse möglich.

Erste Hinweise auf die beteiligten Transportproteine in den LS180-Zellen ergaben sich durch den gemessenen K_m -Wert, denn die beiden Carrier RFC und PCFT besitzen eine sehr unterschiedliche Affinität

für Folsäure. So werden für die Folsäureresorption durch den PCFT K_m -Werte im Bereich von $1,3 \mu\text{M}$ (QIU et al. 2006) bis $1,67 \mu\text{M}$ (NAKAI et al. 2007) angegeben. Die Affinität des RFC gegenüber Folat liegt deutlich niedriger, wobei der K_m -Wert in einem Bereich von $\sim 200 - 400 \mu\text{M}$ liegt (GOLDMAN et al. 1968, SIROTNIAK 1985, WESTERHOF et al. 1995, ZHAO et al. 1998, HONSCHA und PETZINGER 1999, SIERRA und GOLDMAN 1999, WANG et al. 2004). Der in dieser Studie berechnete K_m -Wert von $27,91 \mu\text{M}$ spricht daher für eine Beteiligung beider Transporter an der funktionellen Folataufnahme in den LS180-Zellen. Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich der kinetischen Parameter kam DUDEJA et al. (2001), der in Kolonvesikeln einen K_m -Wert von $9,6 \mu\text{M}$ ermittelte, wie auch ZIMMERMAN (1990), welcher in humaner intestinaler Mucosa (Biopsien) einen K_m -Wert von $15,76 \mu\text{M}$ bestimmen konnte. Beide dabei verwendeten Untersuchungsmethoden spiegeln einen der *in vivo* Situation nahestehenden Versuchsaufbau wieder.

Für eine weiterführende Untersuchung wurden in der zellvermittelten funktionellen Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Folsäure zwei spezifische Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und die initiale Aufnahmegeschwindigkeit V_{influx} bestimmt. PMX und RTX gehören zur Gruppe der Antifolate und werden beide in der Therapie verschiedener Tumorerkrankungen wie dem kolorektalen Karzinom oder dem Pleuramesotheliom eingesetzt (TAKIMOTO 1996). PMX stellt ein hochspezifisches PCFT-Substrat dar (WANG et al. 2002, CHATTOPADHYAY et al. 2006, SHIN et al. 2013). Es wurde für PMX bei pH-Wert 5.5 in RFC-deletierten HeLa-Zellen ein K_i -Wert von $91,0 \text{ nmol/L}$ beschrieben (WANG et al. 2004). Die Aufnahme von RTX erfolgt hingegen hauptsächlich über den RFC (WESTERHOF et al. 1995, CHATTOPADHYAY et al. 2006). Dementsprechend lag in der Studie von WANG et al. (2004) der K_i von RTX mit 531 nmol/L deutlich höher als der K_i von PMX. Allerdings wurde für diese Untersuchung $0,5 \mu\text{mol/L}$ $^3\text{[H]}$ -MTX als Substrat verwendet. Entsprechende Daten zur Inhibition des Folsäuretransportes fehlen in der Literatur.

Bei der funktionellen Aufnahme von $0,1 \mu\text{M}$ $^3\text{[H]}$ -Folsäure in den LS180-Zellen ließ sich für PMX ein K_i -Wert von $0,7112 \mu\text{mol/L}$ und für RTX von $0,4029 \mu\text{mol/L}$ bestimmen. Somit wurde mit RTX eine stärkere Hemmung als mit PMX erreicht, wobei der K_i für PMX im Vergleich zur oben genannten Studie fast um eine Potenz höher liegt. Bei RTX ergab sich eine stärkere Inhibition der Aufnahme als in der Untersuchung von WANG et al. (2004), obgleich die Daten relativ dicht beieinander liegen. Jedoch wurde mit beiden Inhibitoren ab einer eingesetzten Konzentration von ca. $10 \mu\text{M}$ bei Verwendung von $0,1 \mu\text{M}$ Folsäure im Heiß-Kalt-Gemisch eine vollständige Hemmung der Folsäureaufnahme erreicht, d. h. dass in höherer Konzentration auch eine Affinität zum jeweils anderen Rezeptor gegeben ist. Die Durchführung des Versuchs mit $20 \mu\text{M}$ Folsäure und in demselben molaren Verhältnis hinzugegebenen Inhibitoren erbrachte keine Unterschiede (s. Abbildung 21).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sowohl der RFC als auch der PCFT an der Folsäureaufnahme in den LS180-Zellen beteiligt ist. Der RFC scheint jedoch einen etwas höheren Anteil an der Gesamtaufnahme zu tragen als der PCFT. Bei einer reinen RFC-vermittelten Aufnahme hätte RTX jedoch noch zu einer deutlich stärkeren Inhibition führen müssen. Die These einer intestinalen Folataufnahme ausschließlich durch den PCFT konnte durch die im Zusammenhang mit dieser Studie durchgeführten Versuche nicht bestätigt werden.

5.2.3 Beeinflussung durch TCDD und B[a]P

Polyzyklische und halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe sind ubiquitär weit verbreitete Umweltkontaminanten, die ihre zahlreichen toxischen Effekte über den Ah-Rezeptor vermitteln (POLAND und GLOVER 1973, ROWLANDS und GUSTAFSSON 1997, MACDONALD et al. 2004). So wurde in AhR-defizienten (AhR^{-/-})-Mäusen auch in hohen Konzentrationen keine durch TCDD vermittelte Toxizität oder durch B[a]P vermittelte Karzinogenität beobachtet (FERNANDEZ-SALGUERO et al. 1996, SHIMIZU et al. 2000). Allerdings zeigen AhR^{-/-}-Mäuse in ihrem Phänotyp starke Entwicklungsstörungen insbesondere der Leber und des Immunsystems, was darauf hinweist, dass der AhR auch physiologische Aufgaben übernimmt (FERNANDEZ-SALGUERO et al. 1995, FERNANDEZ-SALGUERO et al. 1997). Die spezifische Gensequenz, an die der aktivierte AhR bindet, wird als DRE bezeichnet und befindet sich in der 5'-UTR der Zielgene. Da sie ursprünglich in fremdstoffmetabolisierenden Cytochrom P450-Isoenzymen entdeckt wurde, ging man zunächst davon aus, dass der AhR über die Regulation dieser Gene hauptsächlich für die Metabolisierung von Xenobiotika relevant ist (POLAND et al. 1976, OKEY et al. 1979). Inzwischen konnten SUN et al. (2004) und DERE et al. (2011) mittels Mikroarrayanalysen nachweisen, dass sich mehrere tausend potentielle DREs im humanen Genom befinden. Diese Gene kodieren interessanterweise für sehr unterschiedliche Proteine, die ihre Funktionen in den verschiedensten Stoffwechselwegen ausüben.

Solche DREs konnten auch in der 5'-Promoterregion des Rfc1 der Ratte nachgewiesen werden (HONSCHA et al. 2000), die sich als funktionell aktiv herausstellten und zur Dioxin-induzierten Regulation der Rfc1-vermittelten MTX-Transportaktivität in Rattenhepatozyten führten (HALWACHS et al. 2010). Nachfolgend konnte eine solche Erkennungssequenz mittels Transfac-Analyse auch im humanen RFC-Gen nachgewiesen werden. Da neben dem RFC auch der PCFT an der intestinalen Folataufnahme beteiligt ist (s. 5.2.2), erfolgte mit dem Webtool JASPER eine Analyse der Promoterregion des PCFT, die ebenfalls zu einem positiven Nachweis der DRE-Sequenz führte (MATHELIER et al. 2013). Möglicherweise führt eine Aktivierung dieser Sequenzen über verschiedenste exogene und endogene Liganden auch zu einer Modulierung der funktionellen Folataufnahme in humanen Zellen. Allerdings wurden hinsichtlich dieser Thematik bisher keinerlei Untersuchungen durchgeführt, so dass dies die erste Studie ist, die sich mit dem Einfluss von AhR-induzierenden aromatischen Kohlenwasserstoffen auf den Folattransport beschäftigt.

Um diesen möglicherweise vorhandenen Einfluss von AhR-Liganden auf den Folsäuretransport zu evaluieren, wurden die LS180-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Substanzen TCDD und B[a]P über 24 - 120 h inkubiert und im Anschluss funktionelle Aufnahmestudien (s. 3.2.1.5, 4.2.2) mit Tritium-markierter Folsäure durchgeführt. TCDD und B[a]P wurden in dieser Studie als Modellschubstanzen für die Substanzgruppen HAK und PAK verwendet, da ihre Eigenschaften und Metabolisierung am besten untersucht sind (HARPER et al. 1991, ZEIGER et al. 2001, SILKWORTH et al. 2005).

Als Beurteilungskriterium für die funktionelle Folsäureaufnahme diene insbesondere die Aufnahmegeschwindigkeit innerhalb der initialen Aufnahmephase, da das intrazelluläre Folsäuregleichgewicht möglicherweise durch Faktoren wie die oben beschriebene Elimination durch verschiedene ABC-Transporter beeinflusst wird.

In dieser Studie konnte sowohl mit TCDD als auch mit B[a]P eine deutliche, statistisch signifikante Reduktion der initialen funktionellen Folsäureaufnahme nach einer Inkubationszeit von 72 h beobachtet werden, wobei sich mit Substanzkonzentrationen von 10 nM TCDD und 1 µM B[a]P eine Reduktion der

V_{influx} -Werte um ca. 75 bzw. 65 % verzeichnen ließ (s. Abbildung 23). Insbesondere nach TCDD-Vorbehandlung fand kaum noch ein aktiver Transport in die Zellen statt. In den folgenden Versuchen wurde zudem eine starke Dosisabhängigkeit der Reduktion der carriervermittelten Folsäureaufnahme ermittelt. So ergab sich jeweils mit 1/10 der maximalen Konzentration eine signifikante Herabregulation, die ca. halb so stark in Relation zur maximalen Konzentration ausfiel (s. Abbildung 24). Die Zeitabhängigkeit wurde mit Inkubationszeiten von 24, 72 oder 120 h überprüft. Interessanterweise zeigten beide Kontaminanten nach 24 h einen deutlich geringeren Einfluss auf die funktionelle Folsäureaufnahme als nach 72 h. Bei einer Inkubation mit TCDD lagen die Ergebnisse der Regressionskurve nach 120 h auf demselben Niveau wie nach 72 h. Ein aktiver Transport war hier kaum nachweisbar. Im Gegensatz dazu stiegen die V_{influx} -Werte nach 120 h Inkubation mit 1 μM B[a]P bereits wieder an (s. 4.2.3.2). Dies liegt vermutlich in der zügigen zellulären Metabolisierung von B[a]P begründet, infolgedessen keine Induktion des AhR mehr stattfinden kann (BAUER et al. 1995, XU et al. 2005). Neben den Cytochromen (s. 5.1.2) werden durch B[a]P auch Phase-II-Enzyme induziert, die den Abbau weiter beschleunigen. Zusätzlich induziert der AhR in einem negativen Rückkopplungsmechanismus auch die Expression des AhRR, welches mit dem AhR um die Bindung und Dimerisierung mit dem ARNT konkurriert. Ob die Metabolite von B[a]P ebenfalls Einfluss auf die Folsäureaufnahme haben, konnte nicht komplett ausgeschlossen werden, es ergaben sich jedoch in den Versuchen keinerlei Hinweise. Im Gegensatz dazu kommt es bei TCDD zu einer langandauernden AhR-Induktion, da intrazellulär nur eine vernachlässigbare Verstoffwechselung dieser Substanz stattfindet (VINOPAL und CASIDA 1973, ROSE et al. 1976). Die Halbwertszeit dieser Verbindung beim Menschen beträgt ca. 7 - 10 Jahre (PIRKLE et al. 1989). Somit kann womöglich auch eine langandauernde Exposition mit geringen Konzentrationen zu additiven Effekten führen und Einfluss auf den Folsäuretransport ausüben.

Aufgrund der oben erwähnten DRE-Sequenzen in der Promoterregion von RFC und PCFT ist es denkbar, dass die beobachtete Regulation der Folsäureaufnahme über den AhR vermittelt wird. Um dies zu überprüfen, erfolgte vor der Inkubation der LS180-Zellen mit TCDD oder B[a]P eine Präinkubation mit zwei verschiedenen AhR-Antagonisten (SAL, CH). Im Anschluss wurden wiederum funktionelle Aufnahmestudien mit Tritium-markierter Folsäure durchgeführt (s. 4.2.3.3). Für beide Substanzen wurde in der Literatur von einer potenten, dosisunabhängigen, langandauernden Hemmung der TCDD-induzierten AhR-Signaltransduktion berichtet (MACDONALD et al. 2004, KIM et al. 2006). CH zeigt wahrscheinlich, anders als viele andere AhR-Antagonisten, mit höherer Konzentration keine Agonisten-ähnliche Wirkung oder estrogene Wirkkomponente (KIM et al. 2006). Die These der AhR-vermittelten Reduktion des funktionellen Folsäuretransportes konnte mit den durchgeführten Versuchen bestätigt werden, denn mit SAL und CH ließ sich eine dosisabhängige Umkehr der TCDD-vermittelten Effekte beobachten (s. Abbildung 26, Abbildung 27). Ein wenig anders waren die Ergebnisse mit dem zweiten Umweltkontaminanten B[a]P. Mit 500 μM SAL konnte hier ebenfalls eine Umkehr der Folsäure-Herabregulation erreicht werden, die zwar etwas niedriger ausfiel als in Kombination mit TCDD, aber zu statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zur Gruppe mit der alleinigen B[a]P-Inkubation führte. Ein Einfluss war auch mit einer Präinkubation mit 10 μM CH zu beobachten, jedoch lagen die Messwerte deutlich unter dem Kontrollniveau, so dass sich signifikante Differenzen zur Kontrolle ergaben (s. Abbildung 28 u. Tabelle A4). CH wurde von KIM et al. (2006) als spezifischer, potenter Inhibitor der TCDD-induzierten AhR-abhängigen Transkription identifiziert. Dabei verhindert es sowohl die Bindung von TCDD an den AhR, als auch die TCDD-induzierte Translokation in den Zellkern sowie die Bindung an die DNA. Allerdings scheint die AhR-Inhibition durch CH liganden-spezifisch

zu sein. ZHAO et al. (2010) konnte in seiner Untersuchung aufzeigen, dass CH bevorzugt HAK inhibiert, PAK hingegen kaum, was möglicherweise auf Differenzen hinsichtlich der Bindung an den Ah-Rezeptor beruht. Dies steht im Einklang mit der Annahme, dass die Unterschiede in der Effektivität der Einflussnahme auf den Folsäuretransport auch im Zusammenhang mit der Affinität zum Ah-Rezeptor stehen könnten. So beschreibt HARPER et al. (1991) in seiner Studie, die ebenfalls an LS180-Zellen durchgeführt wurde, eine deutliche Verschiebung des EC_{50} für die AhR-Induktion von TCDD (4×10^{-10} M) hin zu B[a]P ($1,5 \times 10^{-5}$ M). Auch ein Einfluss über andere Regulationsmechanismen, z. B. den Estrogenrezeptor, kann in Bezug auf B[a]P nicht vollständig ausgeschlossen werden (PLISKOVA et al. 2005).

Zusammenfassend demonstrieren diese Aufnahmedaten erstmals eine deutliche zeit- und dosisabhängige Herabregulation der RFC- und PCFT-vermittelten Folsäureaufnahme in humanen LS180-Zellen bei pH 5.5 durch TCDD und B[a]P, die über den AhR-Signalweg erfolgt. Diese Daten stimmen damit überein mit bereits publizierten Daten über TCDD-induzierte Regulation von physiologisch relevanten Transportwegen. OLSEN et al. (1994) beschrieb eine signifikante, zeit- und dosisabhängige Herabregulation der funktionellen Aufnahmeaktivität von GLUT 1 und 4 in mit TCDD behandelten (72 h) NIH 3T3 L1 Präadipozyten. Ebenso konnte FLETCHER et al. (2005) eine deutlich verminderte mRNA-Expression von SLC10A1 (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide, NCTP) und SLC21A5 (organic anion transporter polypeptide 1A2, OATP1A2) nach 7 Tagen folgend einer einmaligen Gabe von 40 µg/kg TCDD in der Rattenleber beobachten. Im Kontrast dazu wurde neben der Herabregulation in verschiedenen Studien auch eine Induktion der funktionellen Aktivität von verschiedenen anderen Carriern (ABC-Effluxtransporter) durch AhR-Liganden beschrieben (CAMPOS et al. 2012, HALWACHS et al. 2013, WANG et al. 2013).

Ob die hier ermittelten hochsignifikanten Effekte möglicherweise auch in einem *in vivo* Versuchsaufbau nachweisbar sind und auch dort signifikante, messbare Veränderungen nach sich ziehen würden, ist zum jetzigen Zeitpunkt schwierig abzuschätzen. Denn die Ausgangssituation in einem geschlossenen *in vitro* System wie den LS180-Zellen erlaubt nur die Untersuchung eines Ausschnitts der komplexen Regulation im Gegensatz zu einem vollständigen Organismus. Eine ausreichende Versorgung mit Folat ist für Mammalia jedoch dringend notwendig, da es ein essentielles Vitamin für den Zellstoffwechsel darstellt. Aufgrund dessen kommt es z. B. bei einer Mangelsituation zur adaptiven Hochregulation aller Folatrezeptoren auf transkriptioneller und translationaler Ebene (SAID et al. 2000, SUBRAMANIAN et al. 2003, LIU et al. 2005, WANI et al. 2012). Bei einer Untersuchung in einem *in vivo* Versuchsaufbau könnte womöglich eine Verminderung des V_{influx} von Folaten durch solch eine adaptive Regulation zum Teil verdeckt werden.

5.3 Regulation der Genexpression von RFC und PCFT in LS180-Zellen

Aufgrund der beobachteten Ergebnisse zur TCDD- und B[a]P-vermittelten Modulation der Folsäureaufnahme wurden weiterführende Untersuchungen zum Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene durchgeführt. Anhand einer Reihe von Studien konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass Transportproteine wie MRPs oder BCRP durch Kernrezeptoren wie CAR oder AhR beeinflusst werden können (XU et al. 2005, JIGOREL et al. 2006, OVANDO et al. 2006, HALWACHS et al. 2013). Hinsichtlich des RFC/Rfc1 sowie des PCFT/Pcft existiert bislang noch wenig Literatur bezüglich einer Kernrezeptor-vermittelten Regulation. In diesem Zusammenhang beschrieb HALWACHS et al. (2010) erstmals eine koordinierte, AhR-vermittelte Reduktion der mRNA des Ratten-Rfc1. Da der Rfc1 der Ratte

und der humane RFC ortholog sind, scheint eine transkriptionelle Regulation des RFC über den AhR möglich (KNEUER und HONSCHA 2004). Bezüglich des PCFT wurde von einer Regulation durch den Hepatocyte Nuclear Factor-4- α (HNF4 α) und dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR) berichtet (ELORANTA et al. 2009, FURUMIYA et al. 2013). Bisher waren in der Literatur keine Hinweise hinsichtlich einer AhR-vermittelten transkriptionellen Regulation zu finden.

Um den Einfluss von TCDD und B[a]P auf die Genexpression von RFC und PCFT zu untersuchen, wurden die LS180-Zellen über 24, 72 und 120 h mit den beiden Substanzen vorbehandelt und die mRNA-Menge mittels qRT-PCR (TaqMan®) bestimmt. Verwendet wurden dabei 1 oder 10 nM TCDD bzw. 0,1 oder 1 μ M B[a]P (s. 3.2.2.6). Zur Berechnung der relativen Genexpression wurden die Messwerte in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt. Für die Normalisierung der Daten wurde die Expression des Referenzgens β -Actin verwendet. Für beide Transporter konnte sowohl mit TCDD als auch B[a]P eine statistisch signifikant verminderte mRNA-Expression in Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen mit einer maximalen Reduktion von ca. 65 % gemessen werden, wobei die Ergebnisse von TCDD in Bezug auf den RFC im Einklang mit der bereits oben erwähnten Studie von HALWACHS et al. (2010) stehen (s. 4.3). Dabei zeigte sich, wie auch in den Aufnahmeversuchen, eine deutliche Zeit- und Dosisabhängigkeit der Daten. In Bezug auf die Dosisabhängigkeit stellte sich die Reduktion der Genexpression nach 72 h für 1 nM TCDD nur minimal dar, so dass sich hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrolle ergaben. Mit 10 nM TCDD und den beiden B[a]P-Konzentrationen ließen sich jedoch eindeutige, statistisch signifikante Ergebnisse wahrnehmen. Im Anschluss wurde dieser Versuch mit einer Inkubationszeit von 120 h wiederholt. Im Unterschied zu den Daten nach 72 h war die Genexpression von RFC und PCFT mit beiden Konzentrationen TCDD bzw. B[a]P um ca. 45 - 65 % reduziert, ein Unterschied in Abhängigkeit von der Dosis ließ sich kaum noch ausmachen. Selbiges spiegelte sich in den zeitabhängigen Versuchen wieder, wo sich nach 24 h Einwirkdauer der AhR-Liganden nur eine geringgradige Reduktion der mRNA-Level von RFC und PCFT ergab (s. Abbildung 33, Abbildung 34 in 4.3.2.2). Im Anschluss wurden wie bereits bei den Aufnahmestudien Versuche mit den beiden AhR-Antagonisten SAL und CH durchgeführt. Bei der Kombination von TCDD mit beiden AhR-Antagonisten stellten sich für RFC und PCFT relative Genexpressionlevel von ca. 120 % im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (100 %) dar (s. Abbildung 35). Damit konnte eindeutig die Vermittlung der Herabregulation über die AhR-Signalkaskade nachgewiesen werden. Dass die mRNA-Level über dem Kontrollniveau lagen, ergibt sich wahrscheinlich über eine Hemmung der AhR-Grundaktivität, da der AhR auch zahlreiche physiologische Aufgaben übernimmt (SCHMIDT et al. 1996, GONZALEZ und FERNANDEZ-SALGUERO 1998, NEBERT et al. 2000, ELFERINK 2003, PUGA et al. 2005, BAROUKI et al. 2007, HAARMANN-STEMMANN et al. 2009).

Im Gegensatz dazu ergab sich mit B[a]P in Kombination mit CH nur eine relative Genexpression von ca. 70 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei CH um einen liganden-selektiven Antagonisten (ZHAO et al. 2010a). Dabei scheint die Hemmung bei Dioxinen deutlich stärker auszufallen als bei PAK oder anderen verwandten Stoffgruppen. Mit SAL in Kombination mit B[a]P lagen die Ergebnisse im Bereich der mit TCDD erreichten Werte, also deutlich über den Kontrollwerten (s. Abbildung 28).

Grundsätzlich konnte eine gute Übereinstimmung zwischen den Genexpressionsdaten und den Daten aus den Ausnahmeversuchen beobachtet werden. Beide AhR-Liganden zeigten eine ähnliche Potenz, die Genexpression der beiden Transporter zu vermindern. In den Aufnahmeversuchen führte TCDD jedoch zu einer deutlich stärkeren Herabregulation der funktionellen Folsäureaufnahme, was zu der Tatsache passt,

dass TCDD der stärkste bekannte AhR-Ligand ist. Ob also möglicherweise andere Effekte neben der Regulation der Genexpression eine Rolle spielen, ist somit nicht auszuschließen. In den Genexpressionsstudien fiel jedoch auf, dass beide Transporter nur in geringen Mengen auf mRNA-Ebene exprimiert werden (im Bereich von 1×10^{-5} bis 1×10^{-6} µg/µl der Standardreihe) und Unterschiede relativ schwierig zu verifizieren waren. So ist diese Methode wahrscheinlich weniger gut für weiterführende Untersuchungen geeignet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind die erste Beschreibung der transkriptionellen Regulation von RFC und PCFT durch TCDD und B[a]P mittels der AhR-Signalkaskade in humanen intestinalen Zellen. Diese Befunde stehen in Einklang mit den Ergebnissen einer Studie von JIGOREL et al. (2006), der in humanen primären Hepatozyten zahlreiche Import- und Exportcarrier auf eine mögliche Regulation durch den Ah-Rezeptor untersuchte. Interessanterweise konnte er dabei eine differentielle Regulation feststellen, da ABC-Carrier (ABCG2, ABCB1), also Exportcarrier, in der Regel hochreguliert und SLC-Carrier (SLC22A1, SLC21A9, SLCO1B3, SLC10A1), also Importcarrier, herunterreguliert werden. Der Autor vermutet in diesen Effekten wichtige Aspekte der Leberdetoxifizierung. Die Regulation von SLC10A1 durch TCDD wurde zusätzlich auch von FLETCHER et al. (2005) in Rattenhepatozyten berichtet. Ebenso konnte OVANDO et al. (2006) in hepatischem Gewebe der Ratte die Herabregulation zahlreicher Gene, unter anderem auch von Importcarriern wie SLC13A3, Serpina 7 und SLCO1A4 nach akuter und chronischer TCDD-Exposition beschreiben.

Die Ergebnisse dieser Dissertation lassen sich also sehr gut in die aktuelle Forschung bezüglich der AhR-vermittelten Regulation von Genen einordnen. Nachdem in Studien von SUN et al. (2004) und DERE et al. (2011) noch zahlreiche weitere DRE-Sequenzen in der Promoterregion verschiedenster Gene nachgewiesen wurden, besteht weiterhin ein hoher Forschungsbedarf bezüglich der Auswirkungen einer Exposition des Menschen gegenüber AhR-Liganden.

5.4 Ausblick

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass TCDD und B[a]P über die AhR-Signalkaskade zur Herabregulation der funktionellen Folsäureaufnahme im intestinalen humanen Zellmodell führt. Als nächstes könnte die Durchführung von ebensolchen Versuchen mit anderen Kontaminanten von Interesse sein. Die Bindungsstelle des AhR ist relativ unspezifisch, weshalb neben den aromatischen Kohlenwasserstoffen möglicherweise eine Vielzahl von Substanzen an den AhR binden kann (DENISON und NAGY 2003, ZHAO et al. 2010a). Liganden mit einer hohen Bindungsaffinität sind in der Regel planare oder co-planare, hydrophobe und relativ unpolare Verbindungen mit polyzyklischer Struktur (ADACHI et al. 2001). Das Spektrum der AhR-Liganden umfasst sowohl synthetische und natürliche exogene Verbindungen, als auch Substanzen endogenen Ursprungs (DENISON und NAGY 2003). Neue Studien haben gezeigt, dass z. B. auch viele aktuell eingesetzte Pestizide wie Prochloraz AhR-Liganden sind (HALWACHS et al. 2013). Wie bereits oben erwähnt, gehören TCDD und B[a]P zu den Substanzgruppen der HAK und PAK und werden häufig als Modellsubstanzen verwendet, da ihre Eigenschaften und Verstoffwechselung am besten untersucht sind (POLAND et al. 1976, ROSE et al. 1976, KOREEDA et al. 1978, WHITLOCK 1989, COLLINS et al. 1991, SHIMIZU et al. 2000). Allerdings gehören sie auch, insbesondere im Fall von TCDD, zu den stärksten Verbindungen aus diesen Gruppen bezüglich der Potenz zur Induktion des AhR (VAN DEN

BERG et al. 1998, UNO et al. 2004), was bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Substanzen berücksichtigt werden muss. Ein weiterer wichtiger und interessanter Aspekt wäre die Untersuchung von möglichen additiven Effekten der Kontaminanten untereinander, da ein Organismus in der Regel nie nur einem einzelnen Kontaminanten ausgesetzt ist. Zudem scheint es bei vielen Kontaminanten, wie auch bei den hier verwendeten Substanzen TCDD und B[a]P, zu einer Stagnation des rückläufigen Trends in der Umwelt- und Lebensmittelbelastung zu kommen (HATTEMER-FREY und TRAVIS 1991, BECKER et al. 2011). Allerdings muss man beachten, dass laut einer Untersuchung von SILKWORTH et al. (2005) der Ah-Rezeptor der häufig als Versuchstiere eingesetzten Nagetiere wie Ratten und Mäusen scheinbar empfindlicher als der des Menschen ist. Aufgrund dessen zweifelt der Autor den Nutzen von Tiermodellen für die Risikobewertung beim Menschen an. Jedoch waren in der hier vorliegenden Arbeit eindeutige Regulationsphänomene sichtbar, die bei gegebener Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation ernährungsphysiologische bzw. toxikologische Konsequenzen haben könnten.

Die LS180-Zellen haben sich als geeignetes Modell für Transportvorgänge am Darm bewährt, so dass hier zahlreiche Möglichkeiten bestehen, weiterführende Untersuchungen mit variierenden Parametern durchzuführen. Zur Bestätigung der Übereinstimmung mit der *in vivo* Situation würde sich eine vergleichende Studie der mRNA-Mengen von Importcarriern und Exportcarriern für Folate in humanen Darmproben sowie den LS180-Zellen mittels qRT-PCR anbieten. Sollte dies vergleichbare Daten liefern, würden die hier nachgewiesenen Effekte zusätzlich an Bedeutung gewinnen und zum Verständnis der Pathogenese von Folatmangelzuständen beitragen. Hilfreich wäre auch eine genaue Kenntnis der beteiligten Transporter am Prozess der intestinalen Folataufnahme. Für eine weitere Unterscheidung wäre der Einsatz von siRNA in Kombination mit Aufnahmeversuchen unter Verwendung der Inhibitoren RTX und PMX sinnvoll. Zu beachten wäre auch hier wieder eine mögliche adaptive Hochregulation der verbleibenden Rezeptoren.

Die Daten dieser Studie leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Ursachen des nach wie vor weit verbreiteten Folatmangels des Menschen (OAKLEY 2002), welcher sich nur unzureichend über eine ernährungsphysiologische Problematik, d. h. eine zu geringe Aufnahme von Folat-Äquivalenten, erklären lässt. Ein solcher Folatmangel kann jedoch klinische Symptome verursachen, die sich insbesondere in schnell teilenden Geweben wie den Blutzellen und den Zellen des Gastrointestinaltraktes manifestieren. Besondere Aufmerksamkeit verlangt der Komplex der NRD. Bei einem zu niedrigen Folatstatus der Mutter steigt das Risiko einer solchen Missbildung des Embryos immens an, vor allem da sich diese Defekte bereits in der frühen Embryonalphase (3. - 4. Schwangerschaftswoche) ausbilden, zu einem Zeitpunkt, zu dem die Mutter häufig noch nicht von der Schwangerschaft weiß (OAKLEY 2002). Somit kommt einer ausreichenden Folatversorgung insbesondere perikonzeptionell eine große Bedeutung zu (RAY et al. 2002), vor allem da das Absinken der Inzidenzrate dieser Missbildung seit Jahren stagniert (BUSBY et al. 2005, HESEKER et al. 2009). So sind weitere Studien hinsichtlich der Entstehung und der Vermeidung von Folatmangelzuständen dringend erforderlich.

6 Zusammenfassung

Franziska Nieke

Beeinflussung der intestinalen Folatresorption durch Umweltkontaminanten am Beispiel eines humanen *in vitro* Modells

Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig, Deutschland

Eingereicht im April 2014

112 Seiten, 36 Abbildungen, 14 Tabellen, 373 Literaturangaben, 2 Anhänge

Schlüsselworte: Cytochrom P450-Induktoren, Folsäure, intestinale Aufnahme, RFC, PCFT, Regulation, AhR

Folate sind als Überträger von C1-Fragmenten verschiedener Oxidationsstufen direkt an der Nukleinsäuresynthese beteiligt und spielen somit eine entscheidende Rolle im Zellstoffwechsel. So kann ein suboptimaler Folatstatus zur Ausprägung einer klinischen Symptomatik führen, die sich primär in Zellen mit hoher Teilungsrate manifestiert. Dabei gilt die megaloblastäre Anämie als Leitsymptom für einen akuten Folatmangel. Herausragende Bedeutung besitzen Folate in der Schwangerschaft, wo ihnen bei der Entwicklung des fetalen Nervensystems eine besondere Rolle zukommt. Bei einem zu niedrigen Serumfolatspiegel der Mutter steigt das Risiko für embryonale Missbildungen wie Neuralrohrdefekte stark an. Die weitere medizinische Relevanz der Folate steht momentan im Fokus der Forschung, wie z. B. der protektive Effekt in Bezug auf bestimmte Krebsformen, die Risikoreduktion für verschiedene kardiovaskuläre Erkrankungen sowie Zusammenhänge zwischen dem Folatstatus und neurologischen Störungen (Alzheimer, Depressionen). Allerdings kann Folat als essentielles Vitamin von Säugetieren nicht selbst synthetisiert werden, sondern muss aus externen Quellen über den Verdauungstrakt aufgenommen werden. Die Resorption aus dem Darm erfolgt nach aktuellem Kenntnisstand insbesondere über den Reduced Folate Carrier (RFC, SLC19A1) und den Proton-Coupled Folate Transporter (PCFT, SLC46A1). Trotz der Existenz dieser spezifischen Transporter ist der Folatmangel des Menschen der häufigste Vitaminmangel in Mitteleuropa. Er lässt sich durch eine ausschließlich ernährungsphysiologische Problematik nur unzureichend erklären. Interessanterweise besitzen sowohl das PCFT-Gen als auch das RFC-Gen in ihrer Promoterregion verschiedene Regulationselemente, unter anderem auch funktionell aktive DREs (Dioxin Response Element), die als Bindungsstelle für einen ligandenaktivierten Transkriptionsfaktor, den nukleären Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR), dienen. DREs wurden bisher hauptsächlich bei fremdstoffmetabolisierenden Enzymen wie z. B. Cytochrom P450-Isoenzymen gefunden und vermitteln bekanntermaßen die toxischen und karzinogenen Effekte von AhR-Liganden. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang ubiquitär verbreitete Umweltkontaminanten wie die polyzyklischen und die halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK, HAK), da sie in der Umwelt sehr persistent sind und sich dadurch in der Lebensmittelkette anreichern. Infolgedessen wurde im Rahmen

dieser Studie der mögliche Einfluss von AhR-Liganden wie TCDD (2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin) und B[a]P (Benzo[a]pyren) auf die carriervermittelte intestinale Folatresorption beim Menschen untersucht sowie die Regulation der Transportproteine RFC und PCFT auf transkriptioneller Ebene experimentell überprüft. Als adäquates *in vitro* Modell diente dabei die humane Kolonzelllinie LS180, für die zunächst eine Charakterisierung erfolgte. Mittels RT-PCR wurde der Nachweis erbracht, dass alle am Folattransport beteiligten Import- und Exportcarrier auf mRNA-Ebene exprimiert werden. Für die Transportproteine RFC und PCFT erfolgte über den Western Blot auch der Nachweis auf Proteinebene. Die Funktionalität der AhR-Signalkaskade, die über methylcholanthrenartige Induktoren wie TCDD zur Induktion von Cytochrom P450 führt, konnte im Folgenden mittels Ethoxyresorufin-O-deethylase-Assay (EROD) überprüft werden. Es zeigte sich nach Induktion mit TCDD (0,01 - 10 nM) oder B[a]P (0,01 - 1 µM) über 12 – 96 h ein hochsignifikanter, dosis- und zeitabhängiger Effekt auf die Cyp1A1 vermittelte Enzymaktivität der Ethoxyresorufin-O-deethylase in den LS180-Zellen. Dabei konnten ligandenabhängige Unterschiede im Induktionsmuster ermittelt werden.

Im Anschluss wurde im intestinalen Zellmodell die initiale konzentrations- und zeitabhängige Folataufnahme bei pH 5.5 über funktionelle Aufnahmeversuche mit Tritium-markierter Folsäure untersucht und charakterisiert. Sie stellte sich als aktiver, sättigbarer Prozess dar, wobei in den unbehandelten LS180-Zellen ca. eine Verdreifachung der intrazellulären Radioaktivität über einen Zeitraum von 2,5 min beobachtet werden konnte. Als kinetische Parameter wurden ein K_m -Wert von 27,91 µM sowie ein V_{max} -Wert von 281,2 pmol/min berechnet. Nachfolgende Untersuchungen mit den spezifischen Inhibitoren Raltitrexed (RTX) und Pemetrexed (PMX) konnten zeigen, dass sowohl PCFT als auch RFC an der funktionellen Folsäureaufnahme bei einem pH-Wert von 5.5 in dem gewählten Versuchsaufbau beteiligt sind. Der RFC scheint jedoch einen etwas höheren Anteil an der Gesamtaufnahme zu haben als der PCFT. In LS180-Zellen, die vorher mit den Modellsubstanzen TCDD (1 bzw. 10 nM) oder B[a]P (0,1 bzw. 1 µM) über 24 - 120 h inkubiert wurden, konnte eine zeit- und dosisabhängige, statistisch signifikante Reduktion der carriervermittelten Folatresorption beobachtet werden, wobei die maximale Verminderung der Aufnahmerate ca. 75 % betrug. Da sich dieser Effekt durch die AhR-Antagonisten Salicylamid (SAL) und CH-223191 (CH) dosisabhängig umkehren ließ, erfolgt die Regulation vermutlich über den AhR-Signalweg. Um den Mechanismus der Regulation zu klären, wurde mit Hilfe der quantitativen qRT-PCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden die Genexpression von RFC und PCFT nach Vorbehandlung mit 1 - 10 nM TCDD oder 0,1 – 1 µM B[a]P über 12 - 120 h untersucht. Analog zu den Aufnahmeversuchen konnte hier eine zeit- und dosisabhängige Reduktion beider Transporter auf transkriptioneller Ebene beobachtet werden. Auch führte eine Vorbehandlung mit CH und SAL wiederum zu einer Umkehr des Effektes, wobei CH wahrscheinlich einen ligandenselektiven AhR-Antagonisten darstellt.

Zusammenfassend konnte durch die vorliegende Arbeit nachgewiesen werden, dass Cytochrom P450-Induktoren über die AhR-Signalkaskade die carriervermittelte Folatresorption in humanen Kolonzellen herabregulieren. Es erscheint anhand der gewonnen Erkenntnisse möglich, dass die Folathomoöstate durch verschiedene Umweltkontaminanten wie z. B. TCDD negativ beeinflusst werden kann und als Folge daraus auch eventuell der Folatmangel der Bevölkerung in Industrienationen zumindest teilweise erklärbar wird. Es ist darüber hinaus denkbar, dass auch andere Fremdstoffe die Folataufnahme beeinflussen, da große planare Strukturen häufig über den AhR-Weg wirken. Weiterführende Studien sind notwendig, um das Verständnis für den Einfluss von Umweltkontaminanten auf die intestinale Folataufnahme zu verbessern.

7 Summary

Franziska Nieke

The investigation of the influence of environmental contaminants on the intestinale folate uptake by using a human *in vitro* cell culture model.

Institute of Pharmacology, Pharmacy and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in April 2014

Keywords: cytochrom P450 inducers, folic acid, intestinal uptake, RFC, PCFT, regulation, AhR

112 pages, 36 figures, 14 tables, 373 references, 2 appendices

Reduced folate supplies the cellular one-carbon pool with C1 carrier units, which are essential for the nucleic acid synthesis and therefore play a crucial role in cell metabolism. Thus, a suboptimal folate nutritional status leads to clinical evidence primarily manifested by cells with a high division rate. In this context, the megaloblastic anemia is considered as cardinal symptom of acute folate deficiency. Furthermore, folate plays an important role during pregnancy, where it is essential for the development of the fetal nervous system. The risk of embryonic malformations such as neural tube defects increases by low serum folate concentrations of the mother. Today, the medical relevance of folate is in the focus of research because some epidemiologic studies suggested that benefit may accrue from folate supplements for certain types of cancer, cardiovascular diseases and neurological disorders (Alzheimer disease). However, mammals cannot synthesize folate *de novo*, therefore the essential vitamin has to be resorbed from the gastrointestinal tract from external sources. The intestinal resorption of folate occurs via a carrier-mediated process that involves the reduced folate carrier (RFC, SLC19A1) as well as the recently described proton-coupled folate transporter (PCFT, SLC46A1). Despite the existence of these specific transporters folate deficiency is still the most frequent vitamin deficiency in Europe. This vitamin deficiency can only partly be explained by inadequate diets. Interestingly, DREs (dioxin response elements) were identified in the promotor region of the PCFT gene as well as the RFC gene. These DREs serve as a binding site for a ligand activated transcription factor, the nuclear aryl hydrocarbon receptor (AhR). DREs have been primarily found in xenobiotic enzymes such as cytochrome P450 isoenzymes and they are well known to mediate the toxic and carcinogenic effects of AhR ligands. In this context common environmental contaminants like the polycyclic and and halogenated aromatic hydrocarbons (PAH, HAH) are of special interest, as they are very persistent in the environment and thereby accumulate in the food chain. Therefore the aim of this thesis was to investigate the possible impact of AhR ligands such as TCDD and B[a]P on the carrier-mediated intestinal folate uptake in humans as well as the transcriptional regulation of the transport proteins RFC and PCFT. As adequate *in vitro* model the human colon cell line LS180 was used. The mRNA expression of all carriers involved in folate transport was investigated by RT-PCR analyses in

LS180 cells using specific primers. Furthermore, protein expression of RFC and PCFT was confirmed by western blot analyses. The functionality of the AhR signaling cascade was analysed by using the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay measuring the induction of cytochrom P450 by methylcholanthren type inducers such as TCDD. After incubation with TCDD (0.01 to 10 nM) or B[a]P (0.01 to 1 μ M) over 12 – 96 h, a highly significant, dose- and time-dependent effect on the Cyp1A1 mediated enzyme activity of EROD was detected in the LS180 cells compared to untreated control cells. In this context, ligand-dependent differences in the induction pattern were observed.

To determine the intestinal folate uptake in LS180 cells the initial concentration- and time-dependent uptake was analyzed at pH 5.5 using functional uptake experiments with tritium-labeled folic acid. The folic acid uptake appears to be a carrier mediated active and kinetically saturable processes confirmed by a triplication of the intracellular radioactivity in untreated LS180 cells over a period of 2.5 min. As kinetic parameters a K_m value of 27.91 μ M and a V_{max} value of 281.2 pmol/min were determined. Following analyses by using the RFC specific inhibitor raltitrexed (RTX) and the PCFT specific inhibitor pemetrexed (PMX) showed that both carriers are involved in the functional folic acid uptake at a pH value of 5.5. However, RFC seems to have a slightly higher proportion of the total folic acid uptake than PCFT. LS180 cells previously treated with the AhR ligands TCDD (1 and 10 nM), or B[a]P (0.1 and 1 μ M) for 24 - 120 h showed a significant time- and dose-dependent decrease of carrier mediated folate uptake, with a maximum reduction of approximately 75 %. This effect was reversed in a dose-dependently manner by adding the AhR antagonist salicylamide (SAL) and CH-223191 (CH). Therefore, the regulation of the RFC and PCFT functional activity presumably occurs via the AhR signaling pathway. In addition, quantitative qRT-PCR analyses showed a time- and dose-dependent reduction of both transporters at the transcriptional level after treatment with 1 – 10 nM TCDD or 0.1 - 1 μ M B[a]P for 24 - 120 h. Pretreatment with SAL and CH showed, comparable to the results of functional transporter activity, a reverse of this effect.

In summary, the results of this thesis show that cytochrome P450 inducers down-regulate the carrier-mediated folate uptake in human colon cells via the AhR signaling cascade. Therefore, the folate homeostasis may be adversely affected by various environmental contaminants such as TCDD. Folate deficiency in industrial nations may therefore be partly explainable through the exposure to AhR inducing environmental contaminants. However, further investigations are required to understand the influence of environmental contaminants on the intestinal folate uptake.

8 Literaturverzeichnis

- Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H et al. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem*. 2001;276(34):31475–8.
- Akkan Z, Kalberlah F, Oltmanns J. Literaturstudie zur Ermittlung des Depositionswertes von Dioxinen, Furanen und dioxinähnlichen PCB. 1. Aufl. Karlsruhe: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg; 2004.
- Alexandrov K, Rojas M, Kadlubar FF, Lang NP, Bartsch H. Evidence of anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis*. 1996;17(9):2081–3.
- Allen LH. Causes of vitamin B12 and folate deficiency. *Food Nutr Bull*. 2008;29(2 Suppl):20–37.
- Amakura Y, Tsutsumi T, Nakamura M, Kitagawa H, Fujino J, Sasaki K et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by some vegetable constituents determined using in vitro reporter gene assay. *Biol Pharm Bull*. 2003;26(4):532–9.
- Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. *Blood*. 1992;79(11):2807–20.
- Appling DR. Compartmentation of folate-mediated one-carbon metabolism in eukaryotes. *FASEB J*. 1991;5(12):2645–51.
- Ashokkumar B, Mohammed Z, Vaziri N, Said H. Effect of folate oversupplementation on folate uptake by human intestinal and renal epithelial cells. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(1):159–66.
- Assaraf YG. Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2007;26(1):153–81.
- Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat*. 2006;9(4-5):227–46.
- Atabay B, Turker M, Ozer EA, Mahadeo K, Diop-Bove N, Goldman ID. Mutation of the proton-coupled folate transporter gene (PCFT-SLC46A1) in Turkish siblings with hereditary folate malabsorption. *Pediatr Hematol Oncol*. 2010;27(8):614–9.
- Aufreiter S, Gregory JF, Pfeiffer CM, Fazili Z, Kim Y, Marcon N et al. Folate is absorbed across the colon of adults: evidence from cecal infusion of (13)C-labeled [6S]-5-formyltetrahydrofolic acid. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(1):116–23.
- Baba T, Mimura J, Gradin K, Kuroiwa A, Watanabe T, Matsuda Y et al. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J Biol Chem*. 2001;276(35):33101–10.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen*. 2005;45(2-3):106–14.
- Balamurugan K, Said HM. Role of reduced folate carrier in intestinal folate uptake. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;291(1):C189–93.
- Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett*. 2007;581(19):3608–15.
- Bauer E, Guo Z, Ueng YF, Bell LC, Zeldin D, Guengerich FP. Oxidation of benzo[a]pyrene by recombinant human cytochrome P450 enzymes. *Chem Res Toxicol*. 1995;8(1):136–42.
- Becker L, Hennecke D, Düring R. Expositions-betrachtung und Beurteilung des Transfers von Dioxin, dioxinähnlichen PCB und PCB –Literaturstudie.1. Aufl. Dessau-Roßlau: Umweltbundesamt; 2011.
- Beitz R, Mensink GB, Fischer B, Thamm M. Vitamins--dietary intake and intake from dietary supplements in Germany. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56(6):539–45.

- Bell KN, Oakley GP. Update on prevention of folic acid-preventable spina bifida and anencephaly. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009;85(1):102–7.
- Bhandari SD, Gregory JF. Folic acid, 5-methyl-tetrahydrofolate and 5-formyl-tetrahydrofolate exhibit equivalent intestinal absorption, metabolism and in vivo kinetics in rats. *J Nutr.* 1992;122(9):1847–54.
- Bièche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R et al. Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics.* 2007;17(9):731–42.
- Blair JA, Matty AJ, Razzaque A. Uptake of 5-methyltetrahydrofolic acid by the rat jejunum. *J Physiol.* 1975;250(2):221–30.
- Blasko I, Hinterberger M, Kemmler G, Jungwirth S, Krampla W, Leitha T et al. Conversion from mild cognitive impairment to dementia: influence of folic acid and vitamin B12 use in the VITA cohort. *J Nutr Health Aging.* 2012;16(8):687–94.
- Bock KW. Aryl hydrocarbon or dioxin receptor: biologic and toxic responses. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1994;125:1–42.
- Boll M, Foltz M, Rubio-Aliaga I, Kottra G, Daniel H. Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J Biol Chem.* 2002;277(25):22966–73.
- Bowman BB, Selhub J, Rosenberg IH. Intestinal absorption of biotin in the rat. *J Nutr.* 1986;116(7):1266–71.
- Brandon EFA, Bosch TM, Deenen MJ, Levink R, van der Wal E, van Meerveld JBM et al. Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;211(1):1–10.
- Bucheli TD, Fent K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit Rev Environ Sci Technol.* 1995;25(3):201–68.
- Buchthal J, Grund KE, Buchmann A, Schrenk D, Beaune P, Bock KW. Induction of cytochrome P4501A by smoking or omeprazole in comparison with UDP-glucuronosyltransferase in biopsies of human duodenal mucosa. *Eur J Clin Pharmacol.* 1995;47(5):431–5.
- Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(17):8185–9.
- Busby A, Abramsky L, Dolk H, Armstrong B, Addor M, Anneren G et al. Preventing neural tube defects in Europe: a missed opportunity. *Reprod Toxicol.* 2005;20(3):393–402.
- Butali A, Little J, Chevrier C, Cordier S, Steegers-Theunissen R, Jugessur A et al. Folic acid supplementation use and the MTHFR C677T polymorphism in orofacial clefts etiology: An individual participant data pooled-analysis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2013;97(8):509–14.
- Butler MA, Guengerich FP, Kadlubar FF. Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P-450 monooxygenases. *Cancer Res.* 1989;49(1):25–31.
- Butterworth CE, Tamura T. Folic acid safety and toxicity: a brief review. *Am J Clin Nutr.* 1989;50(2):353–8.
- Cacciapuoti F. Lowering homocysteine levels with folic acid and B-vitamins do not reduce early atherosclerosis, but could interfere with cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;36(3):258–62.
- Campbell NR. How safe are folic acid supplements? *Arch Intern Med.* 1996;156(15):1638–44.
- Campos CR, Schröter C, Wang X, Miller DS. ABC transporter function and regulation at the blood-spinal cord barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(8):1559–66.

- Cario H, Smith DE, Blom H, Blau N, Bode H, Holzmann K et al. Dihydrofolate reductase deficiency due to a homozygous DHFR mutation causes megaloblastic anemia and cerebral folate deficiency leading to severe neurologic disease. *Am J Hum Genet.* 2011;88(2):226–31.
- Castle WB. Megaloblastic anemia. *Postgrad Med.* 1978;64(4):117–22.
- Chandler CJ, Wang TT, Halsted CH. Pteroylpolyglutamate hydrolase from human jejunal brush borders. Purification and characterization. *J Biol Chem.* 1986;261(2):928–33.
- Chattopadhyay S, Zhao R, Krupenko S, Krupenko N, Goldman I. The inverse relationship between reduced folate carrier function and pemetrexed activity in a human colon cancer cell line. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(2):438–49.
- Chen C, Ke J, Zhou XE, Yi W, Brunzelle JS, Li J et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors. *Nature.* 2013;500(7463):486–9.
- Chen EP, Chen L, Ji Y, Tai G, Wen YH, Ellens H. A mechanism-based mathematical model of aryl hydrocarbon receptor-mediated CYP1A induction in rats using beta-naphthoflavone as a tool compound. *Drug Metab Dispos.* 2010a;38(12):2278–85.
- Chen S, Liao T, Wei Y, Tzeng C, Kao S. Endocrine disruptor, dioxin (TCDD)-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in human trophoblast-like JAR cells. *Mol Hum Reprod.* 2010b;16(5):361–72.
- Chen Y, Hung C, Kay N, Chen C, Kao Y, Yuan S. Progesterone receptor is involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-stimulated breast cancer cells proliferation. *Cancer Lett.* 2012;319(2):223–31.
- Chen Z, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H et al. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 2002;62(11):3144–50.
- Chiao JH, Roy K, Tolner B, Yang CH, Sirotiak FM. RFC-1 gene expression regulates folate absorption in mouse small intestine. *J Biol Chem.* 1997; 272(17):11165–70.
- Choi E, Lee H, Dingle RWC, Kim KB, Swanson HI. Development of novel CH223191-based antagonists of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol.* 2012;81(1):3–11.
- Chun HS, Kim HJ, Choi EH. Modulation of cytochrome P4501-mediated bioactivation of benzo[a]pyrene by volatile allyl sulfides in human hepatoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001;65(10):2205–12.
- Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS et al. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2007;297(21):2351–9.
- Collett A, Tanianis-Hughes J, Warhurst G. Rapid induction of P-glycoprotein expression by high permeability compounds in colonic cells in vitro: a possible source of transporter mediated drug interactions? *Biochem Pharmacol.* 2004;68(4):783–90.
- Collins JF, Brown JP, Dawson SV, Marty MA. Risk assessment for benzo[a]pyrene. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1991;13(2):170–84.
- Cook JC, Dold KM, Greenlee WF. An in vitro model for studying the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to human thymus. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987;89(2):256–68.
- Cook JW, Hewett CL, Hieger I. The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III. *J Chem Soc.* 1933:395–405.
- Czernichow S, Noisette N, Blacher J, Galan P, Mennen L, Hercberg S et al. Case for folic acid and vitamin B12 fortification in Europe. *Semin Vasc Med.* 2005;5(2):156–62.
- Daft FS, McDaniel EG, Herman LG, Romine MK, Hegner JR. Role of coprophagy in utilization of B vitamins synthesized by intestinal bacteria. *Fed Proc.* 1963;22:129–33.
- de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA et al. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE.* 2007;2(9):e898.

- Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP. The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. *J Biol Chem.* 1988;263(33):17221–4.
- Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:309–34.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science.* 1996;274(5286):430–2.
- Dere E, Forgacs AL, Zacharewski TR, Burgoon LD. Genome-wide computational analysis of dioxin response element location and distribution in the human, mouse, and rat genomes. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(4):494–504.
- Desmoulin SK, Hou Z, Gangjee A, Matherly LH. The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol Ther.* 2012;13(14):1355–73.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE). Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Aufl. Bonn: Neuer Umschau Buchverlag; 2013.
- DeVito MJ, Birnbaum LS. Toxikologie of dioxins and related chemicals. In: Schecter A, Gasiewicz T, Hrsg. *Dioxins and Health*, 2. Aufl. Wiley, Hoboken, NJ; 2003. p. 139–162.
- Dixon KH, Lanpher BC, Chiu J, Kelley K, Cowan KH. A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem.* 1994;269(1):17–20.
- Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA. Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol.* 1993;44(5):911–7.
- Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem.* 1993;213(1):29–33.
- Dudeja PK, Kode A, Alnounou M, Tyagi S, Torania S, Subramanian VS et al. Mechanism of folate transport across the human colonic basolateral membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281(1):G54–60.
- Dudeja PK, Torania SA, Said HM. Evidence for the existence of a carrier-mediated folate uptake mechanism in human colonic luminal membranes. *Am J Physiol.* 1997;272(6 Pt 1):G1408–15.
- Edwards NT. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment—a review. *J Environ Qual.* 1983;12(4):427–41.
- Eichholzer M, Tonz O, Zimmermann R. Folic acid: a public-health challenge. *Lancet.* 2006;367(9519):1352–61.
- Elferink CJ. Aryl hydrocarbon receptor-mediated cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res.* 2003;5:261–7.
- Elnakat H, Ratnam M. Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(8):1067–84.
- Eloranta JJ, Zaïr ZM, Hiller C, Häusler S, Stieger B, Kullak-Ublick GA. Vitamin D3 and its nuclear receptor increase the expression and activity of the human proton-coupled folate transporter. *Mol Pharmacol.* 2009;76(5):1062–71.
- Ema M, Sogawa K, Watanabe N, Chujoh Y, Matsushita N, Gotoh O et al. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;184(1):246–53.
- Fei YJ, Kanai Y, Nussberger S, Ganapathy V, Leibach FH, Romero MF et al. Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature.* 1994;368(6471):563–6.
- Ferguson PL, Flintoff WF. Topological and functional analysis of the human reduced folate carrier by hemagglutinin epitope insertion. *J Biol Chem.* 1999;274(23):16269–78.

- Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S et al. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*. 1995;268(5211):722–6.
- Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;140(1):173–9.
- Fernandez-Salguero PM, Ward JM, Sundberg JP, Gonzalez FJ. Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice. *Vet Pathol*. 1997;34(6):605–14.
- Ferrario JB, Byrne CJ, Cleverly DH. 2,3,7,8-Dibenzo-p-dioxins in mined clay products from the United States: evidence for possible natural origin. *Environ Sci Technol*. 2000;34(21):4524–32.
- Fife J, Raniga S, Hider PN, Frizelle FA. Folic acid supplementation and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2011;13(2):132–7.
- Fingerhut MA, Halperin WE, Marlow DA, Piacitelli LA, Honchar PA, Sweeney MH et al. Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *N Engl J Med*. 1991;324(4):212–8.
- Fletcher N, Wahlstrom D, Lundberg R, Nilsson CB, Nilsson KC, Stockling K et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;207(1):1–24.
- Franklin JL, Rosenberg HH. Impaired folic acid absorption in inflammatory bowel disease: effects of salicylazosulfapyridine (Azulfidine). *Gastroenterology*. 1973;64(4):517–25.
- Fromm MF, Leake B, Roden DM, Wilkinson GR, Kim RB. Human MRP3 transporter: identification of the 5'-flanking region, genomic organization and alternative splice variants. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1415(2):369–74.
- Fukumori S, Masago M, Ishida K, Kayano Y, Taguchi M, Hashimoto Y. Temperature-dependent specific transport of levofloxacin in human intestinal epithelial LS180 cells. *Biopharm Drug Dispos*. 2009;30(8):448–56.
- Furumiya M, Inoue K, Ohta K, Hayashi Y, Yuasa H. Transcriptional regulation of PCFT by KLF4, HNF4 α , CDX2 and C/EBP α : implication in its site-specific expression in the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;431(2):158–63.
- Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch*. 2004;447(5):641–6.
- Garcia-Casal MN, Osorio C, Landaeta M, Leets I, Matus P, Fazzino F et al. High prevalence of folic acid and vitamin B12 deficiencies in infants, children, adolescents and pregnant women in Venezuela. *Eur J Clin Nutr*. 2005;59(9):1064–70.
- Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*. 1958;77(2):493–509.
- Gasiewicz TA, Holscher MA, Neal RA. The effect of total parenteral nutrition on the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1980;54(3):469–88.
- Geller J, Kronn D, Jayabose S, Sandoval C. Hereditary folate malabsorption: family report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2002;81(1):51–68.
- Geusau A, Abraham K, Geissler K, Sator MO, Stingl G, Tschachler E. Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ Health Perspect*. 2001;109(8):865–9.
- Gibson TM, Weinstein SJ, Pfeiffer RM, Hollenbeck AR, Subar AF, Schatzkin A et al. Pre- and postfortification intake of folate and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort study in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(4):1053–62.

- Gilpin RK, Wagel DJ. Production, distribution, and fate of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and related organohalogens in the environment. In: Schecter A, Gasiewicz T, Hrsg. Dioxins and Health, 2. Aufl. Wiley, Hoboken, NJ; 2003. p. 89–136.
- Goldman ID. The characteristics of the membrane transport of amethopterin and the naturally occurring folates. *Ann N Y Acad Sci.* 1971;186:400–22.
- Goldman ID, Chattopadhyay S, Zhao R, Moran R. The antifolates: evolution, new agents in the clinic, and how targeting delivery via specific membrane transporters is driving the development of a next generation of folate analogs. *Curr Opin Investig Drugs.* 2010;11(12):1409–23.
- Goldman ID, Lichtenstein NS, Oliverio VT. Carrier-mediated transport of the folic acid analogue, methotrexate, in the L1210 leukemia cell. *J Biol Chem.* 1968;243(19):5007–17.
- Gonen N, Bram EE, Assaraf YG. PCFT/SLC46A1 promoter methylation and restoration of gene expression in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;376(4):787–92.
- Gong M, Cowan KH, Gudas J, Moscow JA. Isolation and characterization of genomic sequences involved in the regulation of the human reduced folate carrier gene (RFC1). *Gene.* 1999;233(1-2):21–31.
- Gonzalez FJ. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev.* 1988;40(4):243–88.
- Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P. The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos.* 1998;26(12):1194–8.
- Gonzalez FJ, Tukey RH, Nebert DW. Structural gene products of the Ah locus. Transcriptional regulation of cytochrome P1-450 and P3-450 mRNA levels by 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol.* 1984;26(1):117–21.
- Gregory JF. Case study: folate bioavailability. *J Nutr.* 2001;131(4 Suppl):1376S–82S.
- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:519–61.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997;388(6641):482–8.
- Guo YL, Yu ML. The Yucheng rice oil poisoning incident. In: Schecter A, Gasiewicz T, Hrsg. Dioxins and Health, 2. Aufl. Wiley, Hoboken, NJ; 2003. p. 893–920.
- Gupta A, Mugundu GM, Desai PB, Thummel KE, Unadkat JD. Intestinal human colon adenocarcinoma cell line LS180 is an excellent model to study pregnane X receptor, but not constitutive androstane receptor, mediated CYP3A4 and multidrug resistance transporter 1 induction: studies with anti-human immunodeficiency virus protease inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(6):1172–80.
- Haarmann-Stemmann T, Bothe H, Abel J. Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(4):508–20.
- Halwachs S, Kneuer C, Honscha W. Downregulation of the reduced folate carrier transport activity by phenobarbital-type cytochrome P450 inducers and protein kinase C activators. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1768(6):1671–9.
- Halwachs S, Lakoma C, Gebhardt R, Schafer I, Seibel P, Honscha W. Dioxin mediates downregulation of the reduced folate carrier transport activity via the arylhydrocarbon receptor signalling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2010;246(1-2):100–6.
- Halwachs S, Wassermann L, Lindner S, Zizzadoro C, Honscha W. Fungicide prochloraz and environmental pollutant dioxin induce the ABCG2 transporter in bovine mammary epithelial cells by the arylhydrocarbon receptor signaling pathway. *Toxicol Sci.* 2013;131(2):491–501.
- Hammond DK, Strobel HW. Ethoxyresorufin O-deethylase activity in intact human cells. *Toxicol In Vitro.* 1992;6(1):41–6.
- Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev.* 2003;55(4):649–73.

- Harper PA, Prokipcak RD, Bush LE, Golas CL, Okey AB. Detection and characterization of the Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the human colon adenocarcinoma cell line LS180. *Arch Biochem Biophys.* 1991;290(1):27–36.
- Hattemer-Frey HA, Travis CC. Benzo[a]pyrene: environmental partitioning and human exposure. *Toxicol Ind Health.* 1991;7(3):141–57.
- Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Eguchi H, Gotoh O, Kawajiri K. Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes. *Carcinogenesis.* 1994;15(5):801–6.
- He L, Vasiliou K, Nebert DW. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum Genomics.* 2009;3(2):195.
- Hellström L. Lack of toxicity of folic acid given in pharmacological doses to healthy volunteers. *Lancet.* 1971;1(7689):59–61.
- Henderson GB, Strauss BP. Characteristics of a novel transport system for folate compounds in wild-type and methotrexate-resistant L1210 cells. *Cancer Res.* 1990;50(6):1709–14.
- Henderson GB, Zevely EM. Transport routes utilized by L1210 cells for the influx and efflux of methotrexate. *J Biol Chem.* 1984;259(3):1526–31.
- Hertrampf E, Cortes F. Folic acid fortification of wheat flour: Chile. *Nutr Rev.* 2004;62(6 Pt 2):S44–9.
- Hertrampf E, Cortes F. National food-fortification program with folic acid in Chile. *Food Nutr Bull.* 2008;29(2 Suppl):S231–7.
- Heseker HB, Mason JB, Selhub J, Rosenberg IH, Jacques PF. Not all cases of neural-tube defect can be prevented by increasing the intake of folic acid. *Br J Nutr.* 2009;102(2):173.
- Hinken M, Halwachs S, Kneuer C, Honscha W. Subcellular localization and distribution of the reduced folate carrier in normal rat tissues. *Eur J Histochem.* 2011;55(1):e3.
- Hinterberger M, Fischer P. Folate and Alzheimer: when time matters. *J Neural Transm.* 2013;120(1):211–24.
- Homberger E, Reggiani G, Sambeth J, Wipf HK. The Seveso accident: its nature, extent and consequences. *Ann Occup Hyg.* 1979;22(4):327–70.
- Honscha W, Dötsch KU, Thomsen N, Petzinger E. Cloning and functional characterization of the bile acid-sensitive methotrexate carrier from rat liver cells. *Hepatology.* 2000;31(6):1296–304.
- Honscha W, Petzinger E. Characterization of the bile acid sensitive methotrexate carrier of rat liver cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999;359(5):411–9.
- Hooijberg JH, de Vries, N A, Kaspers, G J L, Pieters R, Jansen G, Peters GJ. Multidrug resistance proteins and folate supplementation: therapeutic implications for antifolates and other classes of drugs in cancer treatment. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;58(1):1–12.
- Hooijberg JH, Jansen G, Assaraf YG, Kathmann I, Pieters R, Laan AC et al. Folate concentration dependent transport activity of the Multidrug Resistance Protein 1 (ABCC1). *Biochem Pharmacol.* 2004;67(8):1541–8.
- Horne DW. Transport of folates and antifolates in liver. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1993;202(4):385–91.
- Hunter R, Barnes JR, Oakley HF, Matthews DM. Toxicity of folic acid given in pharmacological doses to healthy volunteers. *Lancet.* 1970;1(7637):61–3.
- Hutzinger O, Blumich MJ, van den Berg M, Olie K. Sources and fate of PCDDs and PCDFs: an overview. *Chemosphere.* 1985;14(6–7):581–600.
- Ikuma M, Hanai H, Kaneko E, Hayashi H, Hoshi T. Effects of aging on the microclimate pH of the rat jejunum. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1280(1):19–26.
- Institute of Medicine (IOM). Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin, and choline. 1. Aufl. Washington, D.C: National Academy Press; 2000.

- Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. *Arch Toxicol.* 2002;76(5-6):287–98.
- Jacobsen DW. Knocking out the PCFT. *Blood.* 2011;117(18):4683–5.
- Jeffy BD, Chen EJ, Gudas JM, Romagnolo DF. Disruption of cell cycle kinetics by benzo[a]pyrene: inverse expression patterns of BRCA-1 and p53 in MCF-7 cells arrested in S and G2. *Neoplasia.* 2000;2(5):460–70.
- Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 2007;20(9):1331–41.
- Jiang W, Wang L, Zhang W, Coffee R, Fazili I, Moorthy B. Persistent induction of cytochrome P450 (CYP)1A enzymes by 3-methylcholanthrene in vivo in mice is mediated by sustained transcriptional activation of the corresponding promoters. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;390(4):1419–24.
- Jigorel E, Le Vee M, Boursier-Neyret C, Parmentier Y, Fardel O. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(10):1756–63.
- Kamen B. Folate and antifolate pharmacology. *Semin Oncol.* 1997;24(5 Suppl 18):S18-30-S18-39.
- Kane AB. Animal models of malignant mesothelioma. *Inhal Toxicol.* 2006;18(12):1001–4.
- Karyekar CS, Eddington ND, Dowling TC. Effect of St. John's Wort extract on intestinal expression of cytochrome P4501A2: studies in LS180 cells. *J Postgrad Med.* 2002;48(2):97–100.
- Kazerouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, Rothman N. Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol.* 2001;39(5):423–36.
- Kim S, Henry EC, Kim D, Kim Y, Shin KJ, Han MS et al. Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol.* 2006;69(6):1871–8.
- Kim TH, Yang J, Darling PB, O'Connor DL. A large pool of available folate exists in the large intestine of human infants and piglets. *J Nutr.* 2004;134(6):1389–94.
- Kim Y. Role of folate in colon cancer development and progression. *J Nutr.* 2003;133(11 Suppl 1):3731S-3739S.
- Kimbrough RD, Carter CD, Liddle JA, Cline RE. Epidemiology and pathology of a tetrachlorodibenzodioxin poisoning episode. *Arch Environ Health.* 1977;32(2):77–86.
- King J, Laemmli UK. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol.* 1971;62(3):465–77.
- Klipstein FA, Samloff IM. Folate synthesis by intestinal bacteria. *Am J Clin Nutr.* 1966;19(4):237–46.
- Kneuer C, Honscha KU, Honscha W. Sodium-dependent methotrexate carrier-1 is expressed in rat kidney: cloning and functional characterization. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(3):F564-71.
- Kneuer C, Honscha KU, Honscha W. Rat reduced-folate carrier-1 is localized basolaterally in MDCK kidney epithelial cells and contributes to the secretory transport of methotrexate and fluoresceinated methotrexate. *Cell Tissue Res.* 2005;320(3):517–24.
- Kneuer C, Honscha W. The H(+)-dependent reduced folate carrier 1 of humans and the sodium-dependent methotrexate carrier-1 of the rat are orthologs. *FEBS Lett.* 2004;566(1-3):83–6.
- Kool M, van der Linden, M, Haas M de, Scheffer GL, de Vree, J M, Smith AJ et al. MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6914–9.
- Koreeda M, Moore PD, Wislocki PG, Levin W, Yagi H, Jerina DM. Binding of benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides to DNA, RNA, and protein of mouse skin occurs with high stereoselectivity. *Science.* 1978;199(4330):778–81.

- Kumar CK, Moyer MP, Dudeja PK, Said HM. A protein-tyrosine kinase-regulated, pH-dependent, carrier-mediated uptake system for folate in human normal colonic epithelial cell line NCM460. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6226–31.
- Kumar CK, Nguyen TT, Gonzales FB, Said HM. Comparison of intestinal folate carrier clone expressed in IEC-6 cells and in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol.* 1998;274(1 Pt 1):C289-94.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
- Laftah AH, Latunde-Dada GO, Fakih S, Hider RC, Simpson RJ, McKie AT. Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1). *Br J Nutr.* 2009;101(8):1150–6.
- Lampen A, Bader A, Bestmann T, Winkler M, Witte L, Borlak JT. Catalytic activities, protein- and mRNA-expression of cytochrome P450 isoenzymes in intestinal cell lines. *Xenobiotica.* 1998;28(5):429–41.
- Larsson BK, Sahlberg GP, Eriksson AT, Busk LA. Polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled food. *J Agric Food Chem.* 1983;31(4):867–73.
- Lemos C, Peters GJ, Jansen G, Martel F, Calhau C. Modulation of folate uptake in cultured human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by dietary compounds. *Eur J Nutr.* 2007;46(6):329–36.
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):189–92.
- Li Q, Sai Y, Kato Y, Tamai I, Tsuji A. Influence of drugs and nutrients on transporter gene expression levels in Caco-2 and LS180 intestinal epithelial cell lines. *Pharm Res.* 2003;20(8):1119–24.
- Li W, Harper PA, Tang BK, Okey AB. Regulation of cytochrome P450 enzymes by aryl hydrocarbon receptor in human cells: CYP1A2 expression in the LS180 colon carcinoma cell line after treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or 3-methylcholanthrene. *Biochem Pharmacol.* 1998;56(5):599–612.
- Lioy PL, Waldman JM, Greenberg A, Harkov R, Pietarinen C. The Total Human Environmental Exposure Study (THEES) to benzo(a)pyrene: comparison of the inhalation and food pathways. *Arch Environ Health.* 1988;43(4):304–12.
- Liu M, Ge Y, Cabelof DC, Aboukameel A, Heydari AR, Mohammad R et al. Structure and regulation of the murine reduced folate carrier gene: identification of four noncoding exons and promoters and regulation by dietary folates. *J Biol Chem.* 2005;280(7):5588–97.
- Liu M, Ge Y, Payton SG, Aboukameel A, Buck S, Flatley RM et al. Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier in childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 2006;12(2):608–16.
- Liu XY, Matherly LH. Analysis of membrane topology of the human reduced folate carrier protein by hemagglutinin epitope insertion and scanning glycosylation insertion mutagenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1564(2):333–42.
- Longnecker MP, Michalek JE. Serum dioxin level in relation to diabetes mellitus among Air Force veterans with background levels of exposure. *Epidemiology.* 2000;11(1):44–8.
- MacDonald CJ, Ciolino HP, Yeh GC. The drug salicylamide is an antagonist of the aryl hydrocarbon receptor that inhibits signal transduction induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res.* 2004;64(1):429–34.
- Malouf R, Grimley Evans J. Folic acid with or without vitamin B12 for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;(4):CD004514.
- Marie S, Anderson A, Cresteil T. Transplacental induction of cytochromes P-450IA1 and P-450IA2 by polycyclic aromatic carcinogens: TCDD-binding protein level as the rate-limiting step. *Carcinogenesis.* 1988;9(11):2059–63.

- Mason JB, Dickstein A, Jacques PF, Haggarty P, Selhub J, Dallal G et al. A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(7):1325–9.
- Mathelier A, Zhao X, Zhang AW, Parcy F, Worsley-Hunt R, Arenillas DJ et al. JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 2013;42:D142–7.
- Matherly L, Hou Z, Deng Y. Human reduced folate carrier: translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(1):111–28.
- Matherly LH, Barlowe CK, Phillips VM, Goldman ID. The effects on 4-aminoantifolates on 5-formyltetrahydrofolate metabolism in L1210 cells. A biochemical basis of the selectivity of leucovorin rescue. *J Biol Chem.* 1987;262(2):710–7.
- Matherly LH, Goldman DI. Membrane transport of folates. *Vitam Horm.* 2003;66:403–56.
- Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A et al. TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Database issue):D108–10.
- Maurel P. The use of adult human hepatocytes in primary culture and other in vitro systems to investigate drug metabolism in man. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;22(1–2):105–32.
- Max-Rubner Institut (MRI) 2008. Nationale Verzehrsstudie II, Ergebnisbericht Teil 2 (zitiert vom 28. Februar 2014):121–168, <http://www.was-esse-ich.de/uploads/media/NVSII_Abschlussbericht_Teil_2.pdf>.
- McEwan GT, Schousboe B, Skadhauge E. Direct measurement of mucosal surface pH of pig jejunum in vivo. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1990;37(6):439–44.
- McPartlin J. Folic acid. In: Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B, Hrsg. *Encyclopedia of human nutrition*. 2. Aufl. New York: Elsevier; 2005. p. 257–64.
- Mensink G, Burger M, Beitz R, Yvonne H, Hintzpeter B. Was essen wir heute?: Ernährungsverhalten in Deutschland. Berlin: Robert Koch-Institut; 2002.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* 1999;13(1):20–5.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1619(3):263–8.
- Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K et al. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells.* 1997;2(10):645–54.
- Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R et al. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):742–59.
- Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol.* 1996;34(12):2933–6.
- Moscow JA, Gong M, He R, Sgagias MK, Dixon KH, Anzick SL et al. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1995;55(17):3790–4.
- Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Burke MD. Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:297–316.
- Nabokina S, Ma T, Said H. Mechanism and regulation of folate uptake by human pancreatic epithelial MIA PaCa-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287(1):C142–8.

- Nakai Y, Inoue K, Abe N, Hatakeyama M, Ohta KY, Otagiri M et al. Functional characterization of human proton-coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007;322(2):469–76.
- National Research Council (NRC). Vitamin tolerance of animals. Washington, D.C: National Academy Press; 1987.
- Nebert DW, Gonzalez FJ. P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem*. 1987;56:945–93.
- Nebert DW, Puga A, Vasiliou V. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;685:624–40.
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2000;59(1):65–85.
- Nelson DR. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys*. 1999;369(1):1–10.
- Netsch MI, Gutmann H, Schmidlin CB, Aydogan C, Drewe J. Induction of CYP1A by green tea extract in human intestinal cell lines. *Planta Med*. 2006;72(6):514–20.
- Neubert D. Reflections on the assessment of the toxicity of "dioxins" for humans, using data from experimental and epidemiological studies. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1997; 17(4-5):157–215.
- Nguyen TT, Dyer DL, Dunning DD, Rubin SA, Grant KE, Said HM. Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology*. 1997;112(3):783–91.
- Nicken P, Brauer N, Lampen A, Steinberg P. Influence of a fat-rich diet, folic acid supplementation and a human-relevant concentration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine on the induction of preneoplastic lesions in the rat colon. *Arch Toxicol*. 2012;86(5):815–21.
- Niestroy J. Influence of quercetin and kaempferol on benzo[a]pyrene-mediated effects via AhR- and Nrf2-pathways in human and rat intestinal cell lines [Dissertation med. vet]. Düsseldorf: Heinrich-Heine Universität, 2009.
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi*. 2003;123(5):369–75.
- Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ, St-Pierre MV. Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology*. 2001;33(5):1223–31.
- Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(2):438–45.
- Nutt JE, Razak AR, O'Toole K, Black F, Quinn AE, Calvert AH et al. The role of folate receptor alpha (FRalpha) in the response of malignant pleural mesothelioma to pemetrexed-containing chemotherapy. *Br J Cancer*. 2010;102(3):553–60.
- Oakley GP. Global prevention of all folic acid-preventable spina bifida and anencephaly by 2010. *Community Genet*. 2002;5(1):70–7.
- Okey AB. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmacol Ther*. 1990;45(2):241–98.
- Okey AB, Bondy GP, Mason ME, Kahl GF, Eisen HJ, Guenther TM et al. Regulatory gene product of the Ah locus. Characterization of the cytosolic inducer-receptor complex and evidence for its nuclear translocation. *J Biol Chem*. 1979;254(22):11636–48.
- Olie K, Vermeulen P, Hutzinger, O. Chlorodibenzo-p-dioxins and chlorodibenzofurans are trace components of fly ash and flue gas of some municipal incinerators in The Netherlands. *Chemosphere*. 1977;6(8):455–95.
- Olsen H, Enan E, Matsumura F. Regulation of glucose transport in the NIH 3T3 L1 preadipocyte cell line by TCDD. *Environ Health Perspect*. 1994;102(5):454–8.

- Olson JR, Holscher MA, Neal RA. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the golden Syrian hamster. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1980;55(1):67–78.
- Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*. 1964;239:2370–8.
- Onal IK. Folate deficiency in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(2):253–4.
- Osborne MR, Beland FA, Harvey RG, Brookes P. The reaction of (+/-)-7alpha, 8beta-dihydroxy-9beta, 10beta-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene with DNA. *Int J Cancer*. 1976;18(3):362–8.
- Ovando BJ, Vezina CM, McGarrigle BP, Olson JR. Hepatic gene downregulation following acute and subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci*. 2006;94(2):428–38.
- Pandelova M, Henkelmann B, Roots O, Simm M, Jarv L, Benfenati E et al. Levels of PCDD/F and dioxin-like PCB in Baltic fish of different age and gender. *Chemosphere*. 2008;71(2):369–78.
- Pascussi J, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem M, Maurel P. The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:1–32.
- Pavuk M, Schecter AJ, Akhtar FZ, Michalek JE. Serum 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) levels and thyroid function in Air Force veterans of the Vietnam War. *Ann Epidemiol*. 2003;13(5):335–43.
- Payton SG, Haska CL, Flatley RM, Ge Y, Matherly LH. Effects of 5' untranslated region diversity on the posttranscriptional regulation of the human reduced folate carrier. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1769(2):131–8.
- Payton SG, Whetstine JR, Ge Y, Matherly LH. Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier promoter C: synergistic transactivation by Sp1 and C/EBP beta and identification of a downstream repressor. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1727(1):45–57.
- Petrulis JR, Chen G, Benn S, LaMarre J, Bunce NJ. Application of the ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) assay to mixtures of halogenated aromatic compounds. *Environ Toxicol*. 2001;16(2):177–84.
- Phillips DH. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*. 1983;303(5917):468–72.
- Phillips DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res*. 1999;443(1-2):139–47.
- Pietrzik K, Golly I, Loew D. *Handbuch Vitamine: Für Prophylaxe, Therapie und Beratung*. 1. Aufl. München: Urban & Fischer bei Elsevier; 2008.
- Pirkle JL, Wolfe WH, Patterson DG, Needham LL, Michalek JE, Miner JC et al. Estimates of the half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Vietnam Veterans of Operation Ranch Hand. *J Toxicol Environ Health*. 1989;27(2):165–71.
- Pliskova M, Vondracek J, Vojtesek B, Kozubik A, Machala M. Deregulation of cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells reflects both genotoxic and nongenotoxic events. *Toxicol Sci*. 2005;83(2):246–56.
- Pohjanvirta R, Tuomisto J. Short-term toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in laboratory animals: effects, mechanisms, and animal models. *Pharmacol Rev*. 1994;46(4):483–549.
- Pohl C, Will F, Dietrich H, Schrenk D. Cytochrome P450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. *J Agric Food Chem*. 2006;54(26):10262–8.
- Poland A, Glover E. Chlorinated dibenzo-p-dioxins: potent inducers of delta-aminolevulinic acid synthetase and aryl hydrocarbon hydroxylase. II. A study of the structure-activity relationship. *Mol Pharmacol*. 1973;9(6):736–47.
- Poland A, Glover E. Studies on the mechanism of toxicity of the chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ Health Perspect*. 1973;5:245–51.

- Poland A, Glover E. Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, a potent inducer of aryl hydrocarbon hydroxylase, with 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol*. 1974;10(2):349–59.
- Poland A, Glover E, Kende AS. Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem*. 1976;251(16):4936–46.
- Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22:517–54.
- Pontillo CA, Garcia MA, Pena D, Cocca C, Chiappini F, Alvarez L et al. Activation of c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 signaling pathways and cell migration by hexachlorobenzene in MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Toxicol Sci*. 2011;120(2):284–96.
- Prakash R, Petrie WM. Psychiatric changes associated with an excess of folic acid. *Am J Psychiatry*. 1982;139(9):1192–3.
- Puga A, Ma C, Marlowe JL. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(4):713–22.
- Puga A, Tomlinson CR, Xia Y. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. *Biochem Pharmacol*. 2005;69(2):199–207.
- Qin X, Xu M, Zhang Y, Li J, Xu X, Wang X et al. Effect of folic acid supplementation on the progression of carotid intima-media thickness: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis*. 2012;222(2):307–13.
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E et al. Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell*. 2006; 127(5):917–28.
- Qiu A, Min SH, Jansen M, Malhotra U, Tsai E, Cabelof DC et al. Rodent intestinal folate transporters (SLC46A1): secondary structure, functional properties, and response to dietary folate restriction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(5):C1669–78.
- Rajgopal A, Sierra EE, Zhao R, Goldman ID. Expression of the reduced folate carrier SLC19A1 in IEC-6 cells results in two distinct transport activities. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;281(5):C1579–86.
- Ray JG, Meier C, Vermeulen MJ, Boss S, Wyatt PR, Cole DEC. Association of neural tube defects and folic acid food fortification in Canada. *Lancet*. 2002;360(9350):2047–8.
- Riddick DS, Huang Y, Harper PA, Okey AB. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-methylcholanthrene: comparative studies of Ah receptor binding, transformation, and induction of CYP1A1. *J Biol Chem*. 1994;269(16):12118–28.
- Roberts EA, Golas CL, Okey AB. Ah receptor mediating induction of aryl hydrocarbon hydroxylase: detection in human lung by binding of 2,3,7,8-[3H]tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res*. 1986;46(7):3739–43.
- Rodrigues AD, Prough RA. Induction of cytochromes P450IA1 and P450IA2 and measurement of catalytic activities. *Methods Enzymol*. 1991;206:423–31.
- Roelofsen H, Soroka CJ, Keppler D, Boyer JL. Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J Cell Sci*. 1998;111 (Pt 8):1137–45.
- Rong N, Selhub J, Goldin BR, Rosenberg IH. Bacterially synthesized folate in rat large intestine is incorporated into host tissue folyl polyglutamates. *J Nutr*. 1991;121(12):1955–9.
- Ronis MJ, Rowlands JC, Hakkak R, Badger TM. Inducibility of hepatic CYP1A enzymes by 3-methylcholanthrene and isosafrole differs in male rats fed diets containing casein, soy protein isolate or whey from conception to adulthood. *J Nutr*. 2001;131(4):1180–8.
- Roos PH, Tschirbs S, Hack A, Welge P, Wilhelm M. Different mechanisms of handling ingested polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian species: organ-specific response patterns of CYP1A1-induction after oral intake of PAH-contaminated soils. *Xenobiotica*. 2004;34(9):781–95.

- Rose JQ, Ramsey JC, Wentzler TH, Hummel RA, Gehring PJ. The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin following single and repeated oral doses to the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1976;36(2):209–26.
- Rosenberg DW. Tissue-specific induction of the carcinogen inducible cytochrome P450 isoform, P450IA1, in colonic epithelium. *Arch Biochem Biophys.* 1991;284(1):223–6.
- Rosenberg IH. Drugs and folic acid absorption. *Gastroenterology.* 1972;63(2):353–7.
- Rowlands JC, Gustafsson JA. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol.* 1997;27(2):109–34.
- Said HM, Blair JA, Lucas ML, Hilburn ME. Intestinal surface acid microclimate in vitro and in vivo in the rat. *J Lab Clin Med.* 1986;107(5):420–4.
- Said HM, Chatterjee N, Haq RU, Subramanian VS, Ortiz A, Matherly LH et al. Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;279(6):C1889-95.
- Said HM, Kumar C. Intestinal absorption of vitamins. *Curr Opin Gastroenterol.* 1999;15(2):172–6.
- Said HM, Ma TY, Ortiz A, Tapia A, Valerio CK. Intracellular regulation of intestinal folate uptake: studies with cultured IEC-6 epithelial cells. *Am J Physiol.* 1997;272(2 Pt 1):C729-36.
- Said HM, Mohammed ZM. Intestinal absorption of water-soluble vitamins: an update. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006;22(2):140–6.
- Said HM, Nguyen TT, Dyer DL, Cowan KH, Rubin SA. Intestinal folate transport: identification of a cDNA involved in folate transport and the functional expression and distribution of its mRNA. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1281(2):164–72.
- Said HM, Strum WB. A pH-dependent, carrier-mediated system for transport of 5-methyltetrahydrofolate in rat jejunum. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983;226(1):95–9.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230(4732):1350–4.
- Salojin KV, Cabrera RM, Sun W, Chang WC, Lin C, Duncan L et al. A mouse model of hereditary folate malabsorption: deletion of the PCFT gene leads to systemic folate deficiency. *Blood.* 2011;117(18):4895–904.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2. Aufl. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sandermann W. Dioxin-Die Entdeckungsgeschichte des 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxins (TCDD, Dioxin, Sevesogift). *Naturwiss Rundschau.* 1974;37:173–8.
- Sanjoaquin MA, Allen N, Couto E, Roddam AW, Key TJ. Folate intake and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Int J Cancer.* 2005;113(5):825–8.
- Schechter A, Birnbaum L, Ryan JJ, Constable JD. Dioxins: an overview. *Environ Res.* 2006;101(3):419–28.
- Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(13):6731–6.
- Schwetz BA, Norris JM, Sparschu GL, Rowe UK, Gehring PJ, Emerson JL et al. Toxicology of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ Health Perspect.* 1973;5:87–99.
- Scott JM, Weir DG. Drug-induced megaloblastic change. *Clin Haematol.* 1980;9(3):587–606.
- Segars JH, Driggers PH. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(8):349–54.
- Selhub J, Rosenberg IH. Folate transport in isolated brush border membrane vesicles from rat intestine. *J Biol Chem.* 1981;256(9):4489–93.

- Seliskar M, Rozman D. Mammalian cytochromes P450--importance of tissue specificity. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770(3):458–66.
- Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, JR. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967;28(5):815–20.
- Shayeghi M, Latunde-Dada G, Oakhill J, Laftah A, Takeuchi K, Halliday N et al. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*. 2005;122(5):789–801.
- Shiau YF, Fernandez P, Jackson MJ, McMonagle S. Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am J Physiol*. 1985;248(6 Pt 1):G608-17.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP et al. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res*. 1996;56(13):2979–84.
- Shimada T, Iwasaki M, Martin MV, Guengerich FP. Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA 1535/pSK1002. *Cancer Res*. 1989;49(12):3218–28.
- Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J et al. Benzo(a)pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(2):779–82.
- Shin DS, Mahadeo K, Min SH, Diop-Bove N, Clayton P, Zhao R et al. Identification of novel mutations in the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) associated with hereditary folate malabsorption. *Mol Genet Metab*. 2011;103(1):33–7.
- Shin DS, Zhao R, Fiser A, Goldman ID. The role of the fourth transmembrane domain in proton-coupled folate transporter function as assessed by the substituted cysteine accessibility method. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(12):C1159-67.
- Sierra EE, Brigle KE, Spinella MJ, Goldman ID. pH dependence of methotrexate transport by the reduced folate carrier and the folate receptor in L1210 leukemia cells. Further evidence for a third route mediated at low pH. *Biochem Pharmacol*. 1997;53(2):223–31.
- Sierra EE, Goldman ID. Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. *Semin Oncol*. 1999;26(2 Suppl 6):11–23.
- Silkworth JB, Koganti A, Illouz K, Possolo A, Zhao M, Hamilton SB. Comparison of TCDD and PCB CYP1A induction sensitivities in fresh hepatocytes from human donors, sprague-dawley rats, and rhesus monkeys and HepG2 cells. *Toxicol Sci*. 2005;87(2):508–19.
- Sirotnak FM. Obligate genetic expression in tumor cells of a fetal membrane property mediating "folate" transport: biological significance and implications for improved therapy of human cancer. *Cancer Res*. 1985;45(9):3992–4000.
- Sirotnak FM, Tolner B. Carrier-mediated membrane transport of folates in mammalian cells. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:91–122.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76–85.
- Souci SW, Fachmann W, Kraut H. Die Zusammensetzung der Lebensmittel-Nährwerttabellen 1989/90. 4. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 1989.
- Stanger O. Physiology of folic acid in health and disease. *Curr Drug Metab*. 2002;3(2):211–23.
- Stanger O, Wonisch W. Enzymatic and Non-enzymatic Antioxidative Effects of Folic Acid and Its Reduced Derivates. *Subcell Biochem*. 2012;56:131–61.
- Stark M, Gonen N, Assaraf YG. Functional elements in the minimal promoter of the human proton-coupled folate transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(1):79–85.
- Sterling JB, Hanke CW. Dioxin toxicity and chloracne in the Ukraine. *J Drugs Dermatol*. 2005;4(2):148–50.

- Stevens VL, McCullough ML, Sun J, Jacobs EJ, Campbell PT, Gapstur SM. High levels of folate from supplements and fortification are not associated with increased risk of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2011;141(1):98-105, 105.e1.
- Subramanian V, Chatterjee N, Said H. Folate uptake in the human intestine: promoter activity and effect of folate deficiency. *J Cell Physiol*. 2003;196(2):403–8.
- Subramanian V, Reidling J, Said H. Differentiation-dependent regulation of the intestinal folate uptake process: studies with Caco-2 cells and native mouse intestine. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(3):C828–35.
- Sugihara N, Toyama K, Okamoto T, Kadowaki M, Terao K, Furuno K. Effects of benzo(e)pyrene and benzo(a)pyrene on P-glycoprotein-mediated transport in Caco-2 cell monolayer: a comparative approach. *Toxicol In Vitro*. 2007;21(5):827–34.
- Sun YV, Boverhof DR, Burgoon LD, Fielden MR, Zacharewski TR. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(15):4512–23.
- Sweiry JH, Yudilevich DL. Transport of folates at maternal and fetal sides of the placenta: lack of inhibition by methotrexate. *Biochim Biophys Acta*. 1985;821(3):497–501.
- Takimoto CH. New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications. *Oncologist*. 1996;1(1 & 2):68–81.
- Tavares S, Sousa J, Goncalves P, Araujo JR, Martel F. The effect of folate status on the uptake of physiologically relevant compounds by Caco-2 cells. *Eur J Pharmacol*. 2010;640(1-3):29–37.
- Tchantchou F. Homocysteine metabolism and various consequences of folate deficiency. *J Alzheimers Dis*. 2006;9(4):421–7.
- Tolner B, Roy K, Sirotak FM. Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. *Gene*. 1998;211(2):331–41.
- Tom BH, Rutzky LP, Jakstys MM, Oyasu R, Kaye CI, Kahan BD. Human colonic adenocarcinoma cells. I. Establishment and description of a new line. *In Vitro*. 1976;12(3):180–91.
- Tsuji A, Takanaga H, Tamai I, Terasaki T. Transcellular transport of benzoic acid across Caco-2 cells by a pH-dependent and carrier-mediated transport mechanism. *Pharm Res*. 1994;11(1):30–7.
- Umapathy N, Gnana-Prakasam J, Martin P, Mysona B, Dun Y, Smith S et al. Cloning and functional characterization of the proton-coupled electrogenic folate transporter and analysis of its expression in retinal cell types. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(11):5299–305.
- Unal ES, Zhao R, Qiu A, Goldman ID. N-linked glycosylation and its impact on the electrophoretic mobility and function of the human proton-coupled folate transporter (HsPCFT). *Biochim Biophys Acta*. 2008;1778(6):1407–14.
- Uno S, Dalton TP, Sinclair PR, Gorman N, Wang B, Smith AG et al. Cyp1a1(-/-) male mice: protection against high-dose TCDD-induced lethality and wasting syndrome, and resistance to intrahepatocyte lipid accumulation and uroporphyrin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;196(3):410–21.
- Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2002;38(2):79–85.
- Urquhart BL, Gregor JC, Chande N, Knauer MJ, Tirona RG, Kim RB. The human proton-coupled folate transporter (hPCFT): modulation of intestinal expression and function by drugs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(2):G248–54.
- Urquhart BL, Tirona RG, Kim RB. Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol*. 2007;47(5):566–78.

- van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunstrom B, Cook P, Feeley M et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* 1998;106(12):775–92.
- Vanden Heuvel, J P, Lucier G. Environmental toxicology of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. *Environ Health Perspect.* 1993;100:189–200.
- Vinopal JH, Casida JE. Metabolic stability of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin in mammalian liver microsomal systems and in living mice. *Arch Environ Contam Toxicol.* 1973;1(2):122–32.
- Vrzal R, Ulrichova J, Dvorak Z. Aromatic hydrocarbon receptor status in the metabolism of xenobiotics under normal and pathophysiological conditions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2004;148(1):3–10.
- Walle HE, Jong-van den Berg LT. Ten years after the Dutch public health campaign on folic acid: the continuing challenge. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008;64(5):539–43.
- Wang F, Wang J, Liu D, Su Y. Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. *Anal Biochem.* 2010;399(2):211–7.
- Wang IC, Lee WJ. Polychlorinated dibenzo-p-dioxin, polychlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in farmed fish, water, sediment, and feed. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2010;45(2):201–10.
- Wang X, Cabrera RM, Li Y, Miller DS, Finnell RH. Functional regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier in proton-coupled folate transporter (PCFT) mutant mice. *FASEB J.* 2013;27(3):1167–75.
- Wang X, Qin X, Demirtas H, Li J, Mao G, Huo Y et al. Efficacy of folic acid supplementation in stroke prevention: a meta-analysis. *The Lancet.* 2007;369(9576):1876–82.
- Wang Y, Rajgopal A, Goldman ID, Zhao R. Preservation of folate transport activity with a low-pH optimum in rat IEC-6 intestinal epithelial cell lines that lack reduced folate carrier function. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(1):C65–71.
- Wang Y, Zhao R, Chattopadhyay S, Goldman ID. A novel folate transport activity in human mesothelioma cell lines with high affinity and specificity for the new-generation antifolate, pemetrexed. *Cancer Res.* 2002;62(22):6434–7.
- Wang Y, Zhao R, Goldman ID. Characterization of a folate transporter in HeLa cells with a low pH optimum and high affinity for pemetrexed distinct from the reduced folate carrier. *Clin Cancer Res.* 2004;10(18 Pt 1):6256–64.
- Wang Y, Zhao R, Russell RG, Goldman ID. Localization of the murine reduced folate carrier as assessed by immunohistochemical analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1513(1):49–54.
- Wani NA, Hamid A, Khanduja KL, Kaur J. Folate malabsorption is associated with down-regulation of folate transporter expression and function at colon basolateral membrane in rats. *Br J Nutr.* 2012;107(6):800–8.
- Wani NA, Thakur S, Kaur J. Mechanism of intestinal folate transport during folate deficiency in rodent model. *Indian J Med Res.* 2012;136(5):758–65.
- Wasi S, Tabrez S, Ahmad M. Toxicological effects of major environmental pollutants: an overview. *Environ Monit Assess.* 2013;185(3):2585–93.
- Weisglas-Kuperus N, Patandin S, Berbers GA, Sas TC, Mulder PG, Sauer PJ et al. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environ Health Perspect.* 2000;108(12):1203–7.
- Weitman SD, Lark RH, Coney LR, Fort DW, Frasca V, Zurawski VR et al. Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res.* 1992;52(12):3396–401.
- Westerhof GR, Schornagel JH, Kathmann I, Jackman AL, Rosowsky A, Forsch RA et al. Carrier- and receptor-mediated transport of folate antagonists targeting folate-dependent enzymes: correlates of molecular-structure and biological activity. *Mol Pharmacol.* 1995;48(3):459–71.

- Whetstine JR, Flatley RM, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J.* 2002a;367(Pt 3):629–40.
- Whetstine JR, Witt TL, Matherly LH. The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and sp1 transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism. *J Biol Chem.* 2002b;277(46):43873–80.
- White RE, Coon MJ. Oxygen activation by cytochrome P-450. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:315–56.
- White TB, Hammond DK, Vasquez H, Strobel HW. Expression of two cytochromes P450 involved in carcinogen activation in a human colon cell line. *Mol Cell Biochem.* 1991;102(1):61–9.
- Whitlock JP. The control of cytochrome P-450 gene expression by dioxin. *Trends Pharmacol Sci.* 1989;10(7):285–8.
- Whitlock JP. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39:103–25.
- Whitlock JP, Denison M. Induction of cytochrome P450 enzymes that metabolize xenobiotics. In: Ortiz Montellano PR, Hrsg. *Cytochrome P450: Structure, mechanism, and biochemistry.* 2. Aufl. New York: Plenum Press; 1995. p. 367–391.
- Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit Rev Toxicol.* 2000;30(4):347–570.
- Wielinga P, Hooijberg JH, Gunnarsdottir S, Kathmann I, Reid G, Zelcer N et al. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res.* 2005;65(10):4425–30.
- Williams FM, Flintoff WF. Isolation of a human cDNA that complements a mutant hamster cell defective in methotrexate uptake. *J Biol Chem.* 1995;270(7):2987–92.
- Williams FM, Flintoff WF. Structural organization of the human reduced folate carrier gene: evidence for 5' heterogeneity in lymphoblast mRNA. *Somat Cell Mol Genet.* 1998;24(3):143–56.
- Wittsiepe J, Erlenkämper B, Welge P, Hack A, Wilhelm M. Bioavailability of PCDD/F from contaminated soil in young Goettingen minipigs. *Chemosphere.* 2007a;67(9):S355-64.
- Wittsiepe J, Fürst P, Schrey P, Lemm F, Kraft M, Eberwein G et al. PCDD/F and dioxin-like PCB in human blood and milk from German mothers. *Chemosphere.* 2007b;67(9):S286-94.
- Wolff NA, Thies K, Kuhnke N, Reid G, Friedrich B, Lang F et al. Protein kinase C activation downregulates human organic anion transporter 1-mediated transport through carrier internalization. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):1959–68.
- Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1995;270(29):17468–75.
- Wong SC, Zhang L, Proefke SA, Matherly LH. Effects of the loss of capacity for N-glycosylation on the transport activity and cellular localization of the human reduced folate carrier. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1375(1-2):6–12.
- Xie G, Peng Z, Raufman J. Src-mediated aryl hydrocarbon and epidermal growth factor receptor cross talk stimulates colon cancer cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;302(9):G1006-15.
- Xu C, Li CY, Kong AT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 2005;28(3):249–68.
- Yuasa H, Inoue K, Hayashi Y. Molecular and functional characteristics of proton-coupled folate transporter. *J Pharm Sci.* 2009;98(5):1608–16.
- Zaeslein C. *Vitamine in der Medizin.* 2. Aufl. Basel: Hoffmann-LaRoche; 1982.

- Zeiger M, Haag R, Höckel J, Schrenk D, Schmitz HJ. Inducing effects of dioxin-like polychlorinated biphenyls on CYP1A in the human hepatoblastoma cell line HepG2, the rat hepatoma cell line H4IIE, and rat primary hepatocytes: comparison of relative potencies. *Toxicol Sci.* 2001;63(1):65–73.
- Zeng H, Chen ZS, Belinsky MG, Rea PA, Kruh GD. Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res.* 2001;61(19):7225–32.
- Zhang L, Wong SC, Matherly LH. Structure and organization of the human reduced folate carrier gene. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1442(2-3):389–93.
- Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S, Yang J, Kaminsky LS. Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos.* 1999;27(7):804–9.
- Zhao B, DeGroot DE, Hayashi A, He G, Denison MS. CH223191 Is a Ligand-Selective Antagonist of the Ah (Dioxin) Receptor. *Toxicol Sci.* 2010a;117(2):393–403.
- Zhao R, Assaraf YG, Goldman ID. A reduced folate carrier mutation produces substrate-dependent alterations in carrier mobility in murine leukemia cells and methotrexate resistance with conservation of growth in 5-formyltetrahydrofolate. *J Biol Chem.* 1998;273(14):7873–9.
- Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID. Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr.* 2011;31:177–201.
- Zhao R, Gao F, Hanscom M, Goldman I. A prominent low-pH methotrexate transport activity in human solid tumors: contribution to the preservation of methotrexate pharmacologic activity in HeLa cells lacking the reduced folate carrier. *Clin Cancer Res.* 2004a;10(2):718–27.
- Zhao R, Goldman ID. Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2-3):373–85.
- Zhao R, Hanscom M, Chattopadhyay S, Goldman ID. Selective preservation of pemetrexed pharmacological activity in HeLa cells lacking the reduced folate carrier: association with the presence of a secondary transport pathway. *Cancer Res.* 2004b;64(9):3313–9.
- Zhao R, Matherly LH, Goldman ID. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e4.
- Zhao R, Min SH, Qiu A, Sakaris A, Goldberg GL, Sandoval C et al. The spectrum of mutations in the PCFT gene, coding for an intestinal folate transporter, that are the basis for hereditary folate malabsorption. *Blood.* 2007;110(4):1147–52.
- Zhao R, Qiu A, Tsai E, Jansen M, Akabas MH, Goldman ID. The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Mol Pharmacol.* 2008;74(3):854–62.
- Zhao R, Russell RG, Wang Y, Liu L, Gao F, Kneitz B et al. Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs. *J Biol Chem.* 2001;276(13):10224–8.
- Zhao R, Unal ES, Shin DS, Goldman ID. Membrane topological analysis of the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) by the substituted cysteine accessibility method. *Biochemistry.* 2010b;49(13):2925–31.
- Zhou C, Tabb MM, Sadatrafiei A, Grun F, Blumberg B. Tocotrienols activate the steroid and xenobiotic receptor, SXR, and selectively regulate expression of its target genes. *Drug Metab Dispos.* 2004;32(10):1075–82.
- Zhou K, Zhao R, Geng Z, Jiang L, Cao Y, Xu D et al. Association between B-group vitamins and venous thrombosis: systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *J Thromb Thrombolysis.* 2012;34(4):459–67.

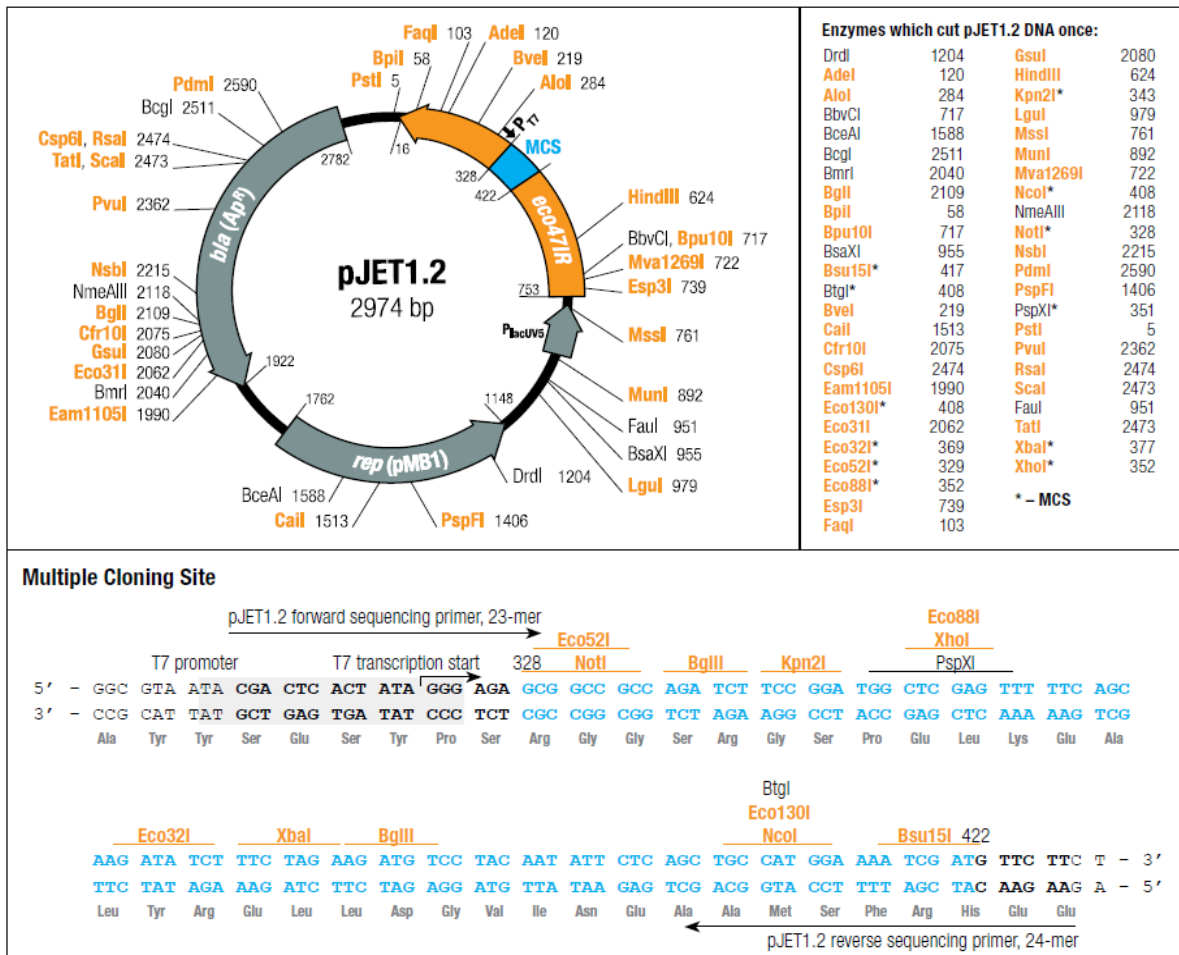
Zimmerman J. Folic acid transport in organ-cultured mucosa of human intestine. Evidence for distinct carriers. *Gastroenterology*. 1990;99(4):964–72.

Zimmermann C, Gutmann H, Hruz P, Gutzwiller J, Beglinger C, Drewe J. Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metab Dispos*. 2005;33(2):219–24.

9 Anhang

Anhang I: Vektorkarte

pJET1.2



Anhang II: Statistische Daten

Tabelle A1: Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme (0,1 μ M) in LS180-Zellen nach Zugabe von PMX oder RTX

Dargestellt sind signifikante Unterschiede, die mittels einer One-Way Anova und nachfolgendem Holm-Sidak Post-hoc Test zwischen den Behandlungsgruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Wert 1 - 7) ermittelt wurden (Abbildung 19, Abbildung 20). Sternchen repräsentieren statistische Signifikanz in Bezug zur unbehandelten Kontrolle und der behandelten Gruppen untereinander ($p > 0,05$ nicht signifikant (n. s.), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

	1 μ M RTX	5 μ M RTX	10 μ M RTX	1 μ M PMX	5 μ M PMX	10 μ M PMX
Wert 1 (0,25 min)						
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
1 μ M RTX/PMX		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
5 μ M RTX/PMX			n. s.			n. s.
Wert 2 (0,5 min)						
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
1 μ M RTX/PMX		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
5 μ M RTX/PMX			n. s.			n. s.
Wert 3 (0,75 min)						
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
1 μ M RTX/PMX		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
5 μ M RTX/PMX			n. s.			n. s.
Wert 4 (1,08 min)						
Kontrolle	**	***	**	n. s.	**	***
1 μ M RTX/PMX		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
5 μ M RTX/PMX			n. s.			n. s.
Wert 5 (1,5 min)						
Kontrolle	***	***	**	**	***	***
1 μ M RTX/PMX		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
5 μ M RTX/PMX			n. s.			n. s.
Wert 6 (2,0 min)						
Kontrolle	***	***	***	***	***	***
1 μ M RTX/PMX		n. s.	n. s.		**	***
5 μ M RTX/PMX			n. s.			n. s.
Wert 7 (2,5 min)						
Kontrolle	***	***	***	**	***	***
1 μ M RTX/PMX		n. s.	n. s.		*	***
5 μ M RTX/PMX			n. s.			n. s.

Tabelle A2: Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme nach Inkubation der LS180-Zellen mit AhR-Agonisten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Dargestellt sind signifikante Unterschiede, die mittels einer One-Way Anova und nachfolgendem Holm-Sidak Post-hoc Test zwischen den Messwerten der Regressionskurven aus Abbildung 25 zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (Wert 1 - 7) ermittelt wurden. Sternchen repräsentieren statistische Signifikanz in Bezug zur unbehandelten Kontrolle und der behandelten Gruppen untereinander ($p > 0,05$ nicht signifikant (n. s.), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

	TCDD 24 h	TCDD 72 h	TCDD 120 h	B[a]P 24 h	B[a]P 72 h	B[a]P 120 h
Wert 1 (0,25 min)						
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
24 h		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
72 h			n. s.			n. s.
Wert 2 (0,5 min)						
Kontrolle	n. s.	n. s.	**	n. s.	n. s.	n. s.
24 h		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
72 h			n. s.			n. s.
Wert 3 (0,75 min)						
Kontrolle	**	***	***	n. s.	***	**
24 h		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
72 h			n. s.			n. s.
Wert 4 (1,08 min)						
Kontrolle	**	***	***	**	***	n. s.
24 h		***	**		n. s.	n. s.
72 h			n. s.			n. s.
Wert 5 (1,5 min)						
Kontrolle	**	***	***	n. s.	***	**
24 h		***	**		**	n. s.
72 h			n. s.			n. s.
Wert 6 (2,0 min)						
Kontrolle	***	***	***	**	***	***
24 h		***	***		**	n. s.
72 h			n. s.			n. s.
Wert 7 (2,5 min)						
Kontrolle	***	***	***	***	***	***
24 h		***	***		***	n. s.
72 h			*			n. s.

Tabelle A3: Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme nach Inkubation der LS180-Zellen mit TCDD in Kombination mit AhR-Antagonisten

Dargestellt sind signifikante Unterschiede der Folsäureaufnahme, die mittels einer One-Way Anova und nachfolgendem Holm-Sidak Post-hoc Test zwischen den Messwerten der Behandlungsgruppen aus Abbildung 26 und Abbildung 27 zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Wert 1 - 7) ermittelt wurden. Sternchen repräsentieren statistische Signifikanz in Bezug zur unbehandelten Kontrolle und der behandelten Gruppen untereinander ($p > 0,05$ nicht signifikant (n. s.), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

	10 nM TCDD 72 h (A)	10 nM TCDD 72 h + 250 µM SAL	10 nM TCDD 72 h + 500 µM SAL	10 nM TCDD 72 h (B)	10 nM TCDD 72 h + 1 µM CH	10 nM TCDD 72 h + 10 µM CH
Wert 1 (0,25 min)						
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
TCDD		n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
TCDD + 1 µM CH/250 µM SAL			n. s.			n. s.
Wert 2 (0,5 min)						
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.	**	n. s.	n. s.
TCDD		n. s.	n. s.		n. s.	n. s.
TCDD + 1 µM CH/250 µM SAL			n. s.			n. s.
Wert 3 (0,75 min)						
Kontrolle	**	n. s.	n. s.	***	n. s.	n. s.
TCDD		n. s.	***		**	**
TCDD + 1 µM CH/250 µM SAL			n. s.			n. s.
Wert 4 (1,08 min)						
Kontrolle	***	n. s.	n. s.	***	**	n. s.
TCDD		n. s.	***		***	***
TCDD + 1 µM CH/250 µM SAL			n. s.			n. s.
Wert 5 (1,5 min)						
Kontrolle	***	**	n. s.	***	**	n. s.
TCDD		*	**		***	***
TCDD + 1 µM CH/250 µM SAL			n. s.			**
Wert 6 (2,0 min)						
Kontrolle	***	***	*	***	**	n. s.
TCDD		**	***		***	***
TCDD + 1 µM CH od. 250 µM SAL			**			**
Wert 7 (2,5 min)						
Kontrolle	***	***	***	***	**	n. s.
TCDD		***	***		***	***
TCDD + 1 µM CH/250 µM SAL			***			**

Tabelle A4: Statistische Daten zur funktionellen Folsäureaufnahme nach Inkubation der LS180-Zellen mit B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten

Dargestellt sind signifikante Unterschiede, die mittels einer One-Way Anova und nachfolgendem Holm-Sidak Post-hoc Test zwischen den Messwerten der verschiedenen Behandlungsgruppen aus Abbildung 28 zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Wert 1 - 7) ermittelt wurden. Sternchen repräsentieren statistische Signifikanz in Bezug zur unbehandelten Kontrolle und der behandelten Gruppen untereinander ($p > 0,05$ nicht signifikant (n. s.), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

	1 μ M B[a]P 72 h	1 μ M B[a]P 72 h + 500 μ M SAL	1 μ M B[a]P 72 h + 10 μ M CH
Wert 1 (0,25 min)			
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.
B[a]P		n. s.	n. s.
B[a]P + 500 μ M SAL			n. s.
Wert 2 (0,5 min)			
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.
B[a]P		n. s.	n. s.
B[a]P + 500 μ M SAL			n. s.
Wert 3 (0,75 min)			
Kontrolle	***	n. s.	n. s.
B[a]P		n. s.	n. s.
B[a]P + 500 μ M SAL			n. s.
Wert 4 (1,08 min)			
Kontrolle	***	n. s.	***
B[a]P		**	n. s.
B[a]P + 500 μ M SAL			n. s.
Wert 5 (1,5 min)			
Kontrolle	***	n. s.	**
B[a]P		**	n. s.
B[a]P + 500 μ M SAL			n. s.
Wert 6 (2,0 min)			
Kontrolle	***	n. s.	**
B[a]P		**	n. s.
B[a]P + 500 μ M SAL			n. s.
Wert 7 (2,0 min)			
Kontrolle	***	n. s.	***
B[a]P		***	n. s.
B[a]P + 500 μ M SAL			n. s.

Tabelle A5: Statistische Auswertung zwischen den relativen mRNA-Mengen von RFC und PCFT in Abhängigkeit von TCDD oder B[a]P in Kombination mit AhR-Antagonisten

Wiedergegeben sind signifikante Unterschiede zwischen den relativen mRNA-Mengen von RFC und PCFT zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen (s. Abbildung 35, Abbildung 36), die über eine One-Way Anova und nachfolgendem Holm-Sidak Post-hoc Test ermittelt wurden. Sternchen repräsentieren statistische Signifikanz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und der behandelten Gruppen untereinander ($p > 0,05$ nicht signifikant (n. s.), $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$). Auch die mRNA-Expressionsmengen von RFC und PCFT in einem Versuchsansatz wurden untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede mittels One-Way Anova und nachfolgendem Holm-Sidak Post-hoc Test überprüft. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

	10 nM TCDD 72 h	10 nM TCDD 72 h + 500 µM SAL	10 nM TCDD 72 h + 10 µM CH
RFC			
Kontrolle	*	n. s.	n. s.
10 nM TCDD		**	**
TCDD + 500 µM SAL			n. s.
PCFT			
Kontrolle	**	n. s.	n. s.
10 nM TCDD		n. s.	***
TCDD + 500 µM SAL			n. s.
	1 µM B[a]P 72 h	1 µM B[a]P 72 h + 500 µM SAL	1 µM B[a]P 72 h + 10 µM CH
RFC			
Kontrolle	*	**	n. s.
1 µM B[a]P		***	n. s.
B[a]P + 500 µM SAL			***
PCFT			
Kontrolle	n. s.	n. s.	n. s.
1 µM B[a]P		**	n. s.
B[a]P + 500 µM SAL			**

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Walther Honscha für die Überlassung des interessanten Themas, für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie kontinuierliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Frau Dr. Sandra Halwachs danke ich ganz herzlich für die Betreuung während der gesamten Arbeit und der Hilfestellung bei der Durchführung und Analyse der verschiedenen Experimente. Auch für die Durchsicht des Manuskriptes möchte ich mich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Louise Waßermann für die unerschütterliche Motivation, die vielen kreativen Einfälle, die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft und natürlich für die Durchsicht des Manuskriptes.

Für die Einarbeitung und die vielen Hilfestellungen beim Erlernen der Laborarbeit sowie der täglichen Unterstützung bedanke ich mich ganz besonders herzlich bei Frau Cathleen Lakoma und Frau Birte Scholz. Ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft hat mir die Promotionsarbeit sehr erleichtert.

Allen Doktoranden des Instituts für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Auch für die vielen netten Gespräche und spaßigen Momente möchte ich mich bedanken.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während der Promotionszeit, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Der größte Dank gebührt allerdings Michél für die motivierende Unterstützung über all die Jahre und die feste Überzeugung, dass diese Promotion irgendwann ihren Abschluss findet.